

**Entwicklung und funktionelle Charakterisierung  
rekombinanter Formen der pro-apoptotischen Enzyme  
Granzym B und Caspase-3 zur gezielten Induktion  
des programmierten Zelltods in Tumorzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14 (neu)  
(Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften)

der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von

**Ulrike Giesübel**  
aus Kassel

Frankfurt (2003)  
(DF1)

Vom Fachbereich 14 (neu) (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

|                      |                         |
|----------------------|-------------------------|
| Dekan:               | Prof. Dr. W. E. Müller  |
| Betreuer der Arbeit: | Prof. Dr. Winfried Wels |
| Gutachter:           | Prof. Dr. Robert Tampé  |

|                        |           |
|------------------------|-----------|
| Datum der Disputation: | 25.8.2003 |
|------------------------|-----------|

*„Ungeheuer ist viel und nichts ungeheurer als der Mensch“*

Sophokles; Antigone

## Zusammenfassung

Zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killer-Zellen sind hochspezialisierte Zellen des Immunsystems, die neben Virus-infizierten und körperfremden auch entartete Tumorzellen durch Induktion von apoptotischem Zelltod eliminieren. Dazu dient der Inhalt von sogenannten zytotoxischen Vesikeln, der nach Kontakt mit einer als schädlich erkannten Zielzelle sekretiert wird. Als Effektormoleküle in diesen Vesikeln sind v. a. die Serin-Protease Granzym B und das membranolytische Protein Perforin für die Aktivierung von Apoptose-Signalwegen verantwortlich. An der Ausführung von Apoptose sind als zentrale Moleküle Mitglieder der Proteinfamilie der Caspasen beteiligt, die infolge von Apoptose-Signalen proteolytisch aktiviert werden und durch Spaltung zellulärer Substrate den apoptotischen Phänotyp der Zelle hervorrufen. Während Perforin für die Aufnahme von Granzym B in das Zytoplasma von Zielzellen verantwortlich ist, wirkt Granzym B als aktive Effektor-Caspase und spaltet sowohl zelluläre Caspasen wie auch verschiedene zentrale Caspasen-Substrate (wie Bid oder ICAD). In beiden Fällen greift Granzym B am unteren Effektorende der Signalwege ein und umgeht damit die meisten regulatorischen Mechanismen, die häufig in Tumorzellen dereguliert sind und damit auch zur Resistenz von Tumoren gegenüber klassischer Chemo- und Strahlentherapie führen. Caspase-3, die außer durch andere Caspasen auch von Granzym B gespalten und aktiviert werden kann, ist nach gegenwärtigem Verständnis das Molekül, in dessen Aktivierung die verschiedenen Apoptose-Signalwege zusammenlaufen und das für die Spaltung der meisten zellulären Caspasen-Substrate sowie die meisten charakteristischen morphologischen Apoptose-Merkmale notwendig ist.

Sowohl Granzym B als auch Caspase-3 stellen damit interessante Moleküle dar, die zur Eliminierung von Tumorzellen durch gezielte Induktion von Apoptose nach intrazellulärer Applikation therapeutisch verwendet werden könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden daher rekombinante Formen insbesondere von Granzym B sowie auch von Caspase-3 für den möglichen Einsatz als Apoptose-induzierende Effektorfunktion in neuen, Tumorzell-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen untersucht. Da zu Beginn der Arbeit nur relativ wenig über die exakte Funktionsweise von Granzym B bekannt war, war es erforderlich, zunächst auch das Verhalten von rekombinantem Granzym B gegenüber Gewebekulturzellen hinsichtlich seiner zytotoxischen Aktivität zu charakterisieren, um Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die Protease oder modifizierte Formen für therapeutische Zwecke zur selektiven Induktion von Apoptose eingesetzt werden könnten.

Rekombinantes humanes Granzym B konnte in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert werden, das vollständig funktional im Vergleich zu gereinigtem endogenen Protein aus NK-Zellen ist. Die enzymatische Aktivität des rekombinanten Proteins wurde mithilfe eines eigenen *in vitro* Systems nachgewiesen, das auf der Spaltung einer rekombinanten Form von Procaspase-3 als physiologischem Substrat für Granzym B basiert. Nach intrazellulärer Applikation mit einem synthetischen Transduktionsreagens induziert rekombinantes Granzym B aus *Pichia pastoris* Apoptose in HeLa Zellen.

Interessanterweise zeigen Kulturen verschiedener adhärenter Tumorzelllinien nach Behandlung mit hohen Konzentrationen an Granzym B über Nacht auffallende morphologische Veränderungen in Abwesenheit von Perforin oder einem funktionellen Äquivalent, die mit dem partiellen Verlust des Kontakts zum Kultursubstrat verbunden sind und bei längerer Inkubation der Zellen zum Verlust der Proliferation und Zelltod durch Apoptose führen. Dieser Effekt von Granzym B ist abhängig von der enzymatischen Aktivität des Proteins und nach rechtzeitigem Entfernen der Protease reversibel. Dies sowie die veränderte Morphologie der Zellen deuten darauf hin, daß Granzym B auch extrazellulär auf Zellen einwirkt und den Aufbau der extrazellulären Matrix verhindert, indem es möglicherweise Komponenten der



extrazellulären Matrix spaltet. Neben der direkten Induktion von Apoptose über den „klassischen“ Granzym B/Perforin-Mechanismus stellt dies damit einen neuen extrazellulären Effekt von Granzym B dar, der wahrscheinlich indirekt zur Induktion von Apoptose durch Anoikis führt. Dieser Effekt ist jedoch für eine mögliche therapeutische Verwendung von Granzym B nicht von Bedeutung, da relativ hohe Proteinkonzentrationen erforderlich sind; niedrigere Granzym B-Konzentrationen, die für therapeutische Anwendungen relevant sein könnten, haben dagegen keine unspezifische zytotoxische Wirkung auf verschiedene etablierte Tumorzelllinien.

Um Granzym B selektiv gegen Tumorzellen zu richten, wurden Möglichkeiten untersucht, die Protease durch Fusion mit dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) mit Tumorzell-spezifischer Zellbindungsaktivität auszustatten, ohne dabei die enzymatische Aktivität zu zerstören. Der zur Familie der EGF-Wachstumsfaktor-Rezeptoren gehörende ErbB2-Rezeptor wird auf einer Vielzahl von Tumoren epithelialen Ursprungs überexprimiert und stellt daher ein geeignetes Zielantigen für eine selektive Antikörper-basierende Tumorthherapie dar. Obwohl rekombinantes Granzym B-scFv(FRP5) Fusionsprotein nicht im präparativen Maßstab in *Pichia pastoris* hergestellt werden konnte, zeigen die gewonnenen Ergebnisse, daß die Fusion heterologer Proteindomänen an den C-Terminus von Granzym B unter Erhalt der enzymatischen Aktivität möglich ist, während zusätzliche Peptidsequenzen am N-Terminus der Protease zumindest partiell zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen.

Aktive Caspase-3 besteht aus zwei Peptiden p12 und p17, die im aktiven Enzym ein Tetramer  $(p12\ p17)_2$  bilden. Rekombinante, enzymatisch aktive humane Caspase-3 konnte durch separate Expression der beiden Untereinheiten in *E. coli* und Rekonstituierung des Enzyms durch gemeinsame Rückfaltung der denaturierten, gereinigten Untereinheiten hergestellt werden. Um diese rekombinante Form von aktiver Caspase-3 selektiv in Tumorzellen zu applizieren, wurden Möglichkeiten untersucht, eine der beiden Untereinheiten mit dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) als Tumorzell-spezifische Zellbindungsdomäne zu fusionieren. Die rekombinanten Fusionsproteine enthielten außerdem eine sogenannte Translokationsdomäne der bakteriellen Toxine Exotoxin A oder Diphtherietoxin, die der Effektorfunktion nach Rezeptor-vermittelter Endozytose den Übergang vom Endosom ins Zytoplasma erlauben. Während die Fusion dieser Proteindomänen an den N- und C-Terminus der p12 Untereinheit sowie an den C-Terminus der p17 Untereinheit zum Verlust der enzymatischen Aktivität nach Rekonstituierung mit der jeweils komplementären Caspase-3 Untereinheit führte, konnte eine verkürzte Translokationsdomäne von Exotoxin A unter Erhalt der Enzymaktivität an den N-Terminus von p17 fusioniert werden. Da dieses Molekül jedoch keine Zellbindungsdomäne besitzt, konnte das rekombinante Fusionsprotein nicht in Tumorzellen aufgenommen werden.

Die gewonnenen Ergebnisse liefern jedoch wichtige grundlegende Informationen, wie rekombinante Formen von Granzym B und Caspase-3 für therapeutische Zwecke in Antikörper-Fusionsproteinen eingesetzt werden könnten. Sie dienen daher als Grundlage für die weitere Entwicklung solcher Moleküle, die gegenwärtig in der Arbeitsgruppe unter Modifizierung der Ansätze, die in dieser Arbeit verfolgt wurden, fortgeführt wird.

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1</b>   | <b>Apoptose – eine Einführung</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.2</b>   | <b>Molekulare Mechanismen des apoptotischen Zelltods</b>   | <b>4</b>  |
| 1.2.1        | Molekulare Effektoren – Die Familie der Caspasen   | 4         |
| 1.2.2        | Signale und Signalleitung  | 6         |
| 1.2.3        | Regulatoren  | 11        |
| <b>1.3</b>   | <b>Induktion von Apoptose durch zytotoxische Lymphozyten</b>   | <b>14</b> |
| 1.3.1        | Effektormoleküle aus zytotoxischen Vesikeln  | 14        |
| 1.3.2        | Das porenbildende Protein Perforin   | 15        |
| 1.3.3        | Die Serin-Protease Granzym B   | 15        |
| 1.3.4        | Mechanismus Granzym B-induzierter Apoptose: Bedeutung von Caspasen, Proteinen der Bcl-2 Familie und weiterer Granzym B-Substrate | 17        |
| <b>1.4</b>   | <b>Apoptose in Tumorzellen – Therapiekonzepte</b>  | <b>19</b> |
| 1.4.1        | Die „klassische“ Chemotherapie und Problem der Therapie-Resistenz  | 20        |
| 1.4.2        | Neue Therapiekonzepte  | 21        |
| <b>1.5</b>   | <b>Ziel dieser Arbeit</b>  | <b>23</b> |
| <b>2</b>     | <b>Material und Methoden</b>   | <b>26</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Material</b>  | <b>26</b> |
| 2.1.1        | Chemikalien, Chromatographie-Medien, Verbrauchsmaterial, Reagenzien  | 26        |
| 2.1.2        | Enzyme   | 26        |
| 2.1.3        | Antikörper und Nachweisreagenzien  | 27        |
| 2.1.4        | Plasmide   | 27        |
| 2.1.5        | Oligonukleotide  | 30        |
| 2.1.6        | Mikroorganismen  | 31        |
| 2.1.7        | Zelllinien   | 32        |
| <b>2.2</b>   | <b>Methoden</b>  | <b>33</b> |
| <b>2.2.1</b> | <b>Arbeiten mit Nukleinsäuren</b>  | <b>33</b> |
| 2.2.1.1      | Amplifizierung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>   | 33        |
| 2.2.1.2      | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>  | 34        |
| 2.2.1.3      | Herstellung von cDNA aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) oder Gewebekulturzellen                                      | 34        |
| 2.2.1.4      | Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)  | 35        |
| 2.2.1.5      | Subklonierung von DNA-Fragmenten   | 36        |
| 2.2.1.6      | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen  | 36        |
| 2.2.1.7      | Transformation von DNA-Konstrukten in <i>Pichia pastoris</i> (Elektroporation)   | 37        |
| <b>2.2.2</b> | <b>Gelelektrophoretische Methoden</b>  | <b>38</b> |
| 2.2.2.1      | Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten   | 38        |
| 2.2.2.2      | Native Polyacrylamidgele für DNA-Analysen  | 38        |
| 2.2.2.3      | SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli und Färbung mit Coomassie und mit Silber nach Morrissey              | 38        |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>2.2.3</b> | <b>Arbeiten mit Proteinen .....</b>  | <b>39</b> |
| 2.2.3.1      | Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....  | 39        |
| 2.2.3.2      | Periplasmapräparation aus <i>E. coli</i> Expressionskulturen.....  | 40        |
| 2.2.3.3      | Expression rekombinanter Proteine in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> .....   | 40        |
| 2.2.3.4      | Immunisierung von Balb/c Mäusen zur Gewinnung von anti-Granzym B Antiserum .....   | 41        |
| 2.2.3.5      | Immunodetektion von Proteinen (Western blot) .....   | 41        |
| 2.2.3.6      | Reinigung rekombinanter His-tag-Fusionsproteine über Ni <sup>2+</sup> -Affinitätschromatographie .....   | 42        |
| 2.2.3.7      | Renaturierung von Proteinen .....  | 43        |
| 2.2.3.8      | Konzentrierung von Proteinlösungen.....  | 44        |
| 2.2.3.9      | Abspaltung von GST aus GST-Fusionsproteinen mit Thrombin oder Faktor Xa .....  | 44        |
| 2.2.3.10     | Deglykosylierung der in <i>P. pastoris</i> exprimierten Proteine .....   | 44        |
| 2.2.3.11     | Bindungsstudien.....   | 45        |
| 2.2.3.12     | Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B und Caspase-3.....  | 45        |
| 2.2.3.13     | <i>in vitro</i> Biotinylierung von gereinigtem Granzym B aus <i>Pichia pastoris</i> .....  | 46        |
| <b>2.2.4</b> | <b>Arbeiten mit Zellkulturen .....</b>   | <b>46</b> |
| 2.2.4.1      | Zellkultur.....  | 46        |
| 2.2.4.2      | Herstellung von Gesamtzellextrakt .....  | 47        |
| 2.2.4.3      | Immunfluoreszenzfärbung.....   | 47        |
| 2.2.4.4      | Zytotoxizitätstest (MTT) .....   | 48        |
| 2.2.4.5      | Nachweis von Apoptose .....  | 48        |
| 2.2.4.6      | Einschleusen von Granzym B und Caspase-3 in HeLa Zellen mithilfe des BioPORTER Reagens.....  | 49        |
| <b>3</b>     | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3.1</b>   | <b><u>Heterologe Expression von rekombinantem humanem Granzym B und Überprüfung der enzymatischen Aktivität <i>in vitro</i></u> .....</b>                          | <b>52</b> |
| 3.1.1        | Ausgangssituation .....  | 52        |
| 3.1.2        | Untereinheitenstruktur von Granzym B .....   | 52        |
| 3.1.3        | Klonierung der cDNA von humanem Granzym B .....  | 53        |
| 3.1.4        | Expression von Granzym B in <i>E. coli</i> .....   | 53        |
| 3.1.5        | Etablierung eines <i>in vitro</i> Nachweissystems der enzymatischen Aktivität von Granzym B: Spaltung von Procaspase-3 als natürlichem Substrat für Granzym B..... | 56        |
| 3.1.6        | Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung von polyklonalem anti-Granzym B Antiserum .....   | 59        |
| 3.1.7        | Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.6 .....   | 60        |
| 3.1.8        | Expression von Granzym B in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> .....  | 60        |
| 3.1.9        | Nachweis der enzymatischen Aktivität von gereinigtem rekombinantem Granzym B aus <i>P. pastoris</i> .....  | 62        |
| 3.1.10       | Herstellung einer enzymatisch inaktiven Granzym B Mutante GrB S183A .....  | 64        |
| 3.1.11       | Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.8 bis 3.1.10 .....  | 66        |
| <b>3.2</b>   | <b><u>Funktionelle Charakterisierung von rekombinantem Granzym B aus <i>Pichia pastoris</i></u> .....</b>  | <b>66</b> |
| 3.2.1        | <i>E. coli</i> Cytolysin A als potentieller Ersatz für Perforin zur Induktion von Apoptose durch Granzym B .....   | 67        |
| 3.2.2        | Induktion von Apoptose in HeLa Zellen durch rekombinantes Granzym B nach Einschleusen in Zellen mithilfe des BioPORTER Reagens.....                                | 69        |
| 3.2.3        | Effekte von rekombinantem Granzym B auf Gewebekulturzellen in Abwesenheit von Perforin.....  | 71        |

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| 3.2.4      | Untersuchung der Internalisierung und intrazellulären Lokalisation von rekombinantem Granzym B in HeLa Zellen.....   | 73         |
| 3.2.5      | Morphologische Veränderungen von Gewebekulturzellen nach Behandlung mit rekombinantem Granzym B.....   | 76         |
| 3.2.6      | Untersuchung der Expression von Aggrecan als einem möglichen Zielprotein von Granzym B in der extrazellulären Matrix von Zellen.....                                   | 80         |
| 3.2.7      | Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.6 .....   | 81         |
| <b>3.3</b> | <b>Konstruktion und Charakterisierung von Granzym B-Fusionsproteinen zur Aufnahme in Tumorzellen</b>   | <b>82</b>  |
| 3.3.1      | Expression und funktionelle Charakterisierung von Granzym B-tat zur intrazellulären Aufnahme von Granzym B und Akkumulierung im Zellkern .....                         | 82         |
| 3.3.2      | Konstruktion von Granzym B-Fusionsproteinen mit „single chain“ Antikörper und bakterieller Translokationsdomäne zur gezielten Aufnahme in Tumorzellen.....             | 85         |
| 3.3.3      | Expression von GrB-DT-scFv(FRP5) und GrB-scFv(FRP5) in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> .....   | 87         |
| 3.3.4      | Expression von Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> als GST-Fusionen mit modifizierter Faktor Xa Spaltstelle.....                                   | 93         |
| 3.3.5      | <i>In vitro</i> Biotinylierung von rekombinantem Granzym B und Kopplung mit einem Streptavidin-scFv(FRP5) Fusionsprotein zur spezifischen Aufnahme in Tumorzellen..... | 96         |
| <b>3.4</b> | <b>Caspase-3 als Effektorfunktion in Tumorzell-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen: Konstruktion und funktionelle Charakterisierung</b>                           | <b>101</b> |
| 3.4.1      | Expression enzymatisch aktiver Caspase-3 in <i>E. coli</i> .....   | 102        |
| 3.4.2      | Expression verschiedener Caspase-3-Antikörper Fusionsproteine in <i>E. coli</i> und funktionelle Charakterisierung .....   | 105        |
| 3.4.3      | Konstruktion und Expression modifizierter Caspase-3-Fusionsproteine.....   | 109        |
| 3.4.4      | Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1 bis 3.4.3 .....   | 111        |
| <b>4</b>   | <b>Diskussion</b>  | <b>112</b> |
| 4.1        | Produktion von rekombinantem, enzymatisch aktivem humanen Granzym B .....  | 112        |
| 4.2        | Effekt von rekombinantem Granzym B auf Kulturen etablierter Tumorzelllinien .....  | 114        |
| 4.3        | Granzym B als Effektorfunktion für Tumorzell-spezifische therapeutisch einsetzbare Moleküle.....   | 117        |
| 4.4        | Das Konzept multifunktionaler Fusionsproteine als „maßgeschneiderte“ therapeutische Werkzeuge.....   | 120        |
| 4.5        | Caspase-3 als pro-apoptotische Effektorfunktion in Tumorzell-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen.....   | 123        |
| 4.6        | Pro-apoptotische Moleküle für den therapeutischen Einsatz in anti-Tumor Strategien.....  | 126        |
| <b>5</b>   | <b>Abkürzungen und Einheiten</b>   | <b>129</b> |
| <b>6</b>   | <b>Literatur</b>   | <b>131</b> |
| <b>7</b>   | <b>Anhang</b>  | <b>147</b> |

# 1 Einleitung

## 1.1 Apoptose – eine Einführung

### *Begriffsdefinition*

Das Sterben von Zellen ist wie die Zellteilung ein physiologischer Vorgang, der für die Entwicklung und Homöostase vielzelliger Organismen notwendig ist (Übersicht: [Lockshin, 2001; Vaux, 1999; Lincz, 1998; Jacobson, 1997]). Von den ca. 30 Billionen Zellen eines erwachsenen menschlichen Körpers sterben täglich ca. 10 Milliarden, alleine um die Zahl der durch Mitose neu gebildeten Zellen auszugleichen und so die Konstanzhaltung des Organismus zu gewährleisten.

Als physiologischer Zelltod kann dabei das Sterben von Zellen in einem Organismus betrachtet werden, das unter Beteiligung endogener Proteine aufgrund eines Prozesses erfolgt, der durch den Organismus selbst eingeleitet wird mit dem Ziel, die eigenen Zellen zu töten [Vaux, 1999; Vaux, 1996].

Der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde 1964 von Lockshin und Williams zur Beschreibung der kontrollierten Eliminierung spezifischer Zellen während der Umwandlung von Larven der Seidenmotte zu vollentwickelten Motten verwendet. Diese Zellen zeigen eine Abfolge immer gleicher, d. h. offensichtlich genetisch festgelegter Veränderungen, die zu ihrer eigenen Vernichtung führen. Ursprünglich bezeichnete der Begriff „programmierter Zelltod“ daher speziell den entwicklungsbedingten Tod von Zellen, der als Folge eines bestimmten physiologischen, „programmierten“ Stimulus eintritt [Lockshin, 1964] und der eine Neusynthese von Proteinen erfordert [Tata, 1966].

Davon unabhängig führten Kerr, Wyllie und Currie 1972 zur Beschreibung der charakteristischen morphologischen Veränderungen, die in sterbenden Zellen beobachtet wurden (vgl. unten), den Begriff „Apoptose“ ein. Ob der Zelltod als Folge eines physiologischen (Embryonalentwicklung) oder pathologischen (Toxinbehandlung von Zellen) Stimulus eintritt, war dabei für diese Definition zunächst nicht von Interesse. In dem hochgradig geordnet verlaufenden Prozeß des Sterbens von Zellen sahen die Autoren einen konservierten Mechanismus, der für die Homöostase von Geweben wichtig ist und der wie die Zellteilung ein Aspekt von Leben ist („Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics“; [Kerr, 1972]). Zur Beschreibung wählten sie den griechischen Begriff für das Abfallen welcher Blätter von Bäumen im Herbst (griech. apo: ab, weg, ptosis: Fallen, Sturz).

Inzwischen werden die Begriffe „programmierter Zelltod“ und „Apoptose“ weitgehend synonym verwendet. Prozesse, die zu den für Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen führen, werden auch als programmierter Zelltod bezeichnet, unabhängig davon, ob sie entwicklungsbedingt sind oder nicht. Allerdings sind neben Apoptose weitere Formen des zellulären Selbstmords bekannt, die mechanistisch und morphologisch unterschiedlich verlaufen (z. B. lysosomaler Zelltod oder „autophagy“; [Bursch, 2001]), und nicht alle Fälle von Apoptose erfordern die Neusynthese von Proteinen, wie ursprünglich für programmierten Zelltod beschrieben (z. B. Apoptose nach Angriff durch zytotoxische T-Zellen, vgl. 1.3).

Im Gegensatz zum Zelltod durch Nekrose, der durch Verletzung, schwerwiegende Schädigung oder Vergiftung von Zellen hervorgerufen wird, ist Apoptose nach heutigem Verständnis ein aktiver Prozeß der zellulären Selbstvernichtung, der durch Signale von außen oder Signale, die in der Zelle selber entstehen, ausgelöst werden kann (vgl. 1.2.2). Unter Beteiligung der bekannten molekularen Effektoren (vgl. 1.2.1) führt Apoptose innerhalb kurzer Zeit (Minuten bis Stunden) über Blasenbildung der Zellmembran, Schrumpfen der Zelle, Frag-

mentierung von Proteinen, Chromatin-Kondensation, DNA-Degradierung, Abschnürung von Zellfragmenten und Phagozytose dieser Partikel zum vollständigen Abbau der Zelle, ohne daß dabei Nachbarzellen negativ beeinflusst werden oder eine Immunreaktion induziert wird. Dagegen schwellen Zellen, die nekrotischen Zelltod sterben, an und platzen, wobei der Zellinhalt in das umgebende Gewebe ausgeschüttet wird und dort eine Entzündungsreaktion hervorruft. Im Gegensatz zu Apoptose ist Nekrose ein spontaner Prozeß, für den kein genetisches Programm existiert. Allerdings bestehen Querverbindungen zwischen beiden Prozessen. Zum Beispiel führt die Aktivierung von Fas (1.2.2) in einigen Fällen auch zu Nekrose [Holler, 2000; Matsumura, 2000] und Bcl-2 (1.2.3) inhibiert neben Apoptose ebenfalls Nekrose [Single, 2001]. Beide Formen von Zelltod treten darüber hinaus auch gemeinsam auf. Verletzungsbedingte Nekrose führt z. B. oft zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die in benachbarten Zellen Apoptose induzieren. Andererseits wird bei massiver Apoptose häufig Sekundär-Nekrose beobachtet.

### ***Physiologische Bedeutung***

Physiologische Mechanismen des programmierten Zelltods sind beteiligt an der Entwicklung und Morphogenese vielzelliger Organismen sowie der Kontrolle der Gesamtzellzahl. Außerdem dienen sie als Abwehrstrategie gegen Virus-infizierte, fremde, mutierte oder geschädigte Zellen (Übersicht: [Meier, 2000; Vaux, 1999; Jacobson, 1997]).

Organe entstehen häufig mit einer zu großen Zellzahl, und überflüssige Zellen werden später durch Apoptose wieder vernichtet. Ein Beispiel ist die Entwicklung von Fingern und Zehen durch Apoptose der Zellen, die zwischen den späteren Fingern oder Zehen liegen. Die Ausbildung von Gefäßen oder Körperhöhlen erfolgt ebenfalls durch das kontrollierte Absterben von Zellen. Eine entscheidende Rolle spielt Apoptose auch für die Ausbildung des Nervensystems [Yuan, 2000; Raff, 1993] sowie für die Entstehung und richtige Funktionsweise des Immunsystems [Krammer, 2000; Winoto, 1997; Krammer, 1994]. Nerven- und Immunzellen werden dabei ebenfalls zunächst in viel zu großer Anzahl produziert. Nervenzellen, die keine produktiven synaptischen Verbindungen eingehen sowie nicht-funktionelle oder autoreaktive Immunzellen (positive und negative Selektion), werden dann jedoch wieder eliminiert. Von den gesamten gebildeten Immunzellen werden so ca. 95% durch Apoptose wieder vernichtet. Die Bedeutung von Apoptose für die Entstehung von Nerven- und Immunsystem wird auch an knockout-Mäusen deutlich, denen zentrale Komponenten der Apoptose-Maschinerie fehlen, so daß Apoptose nicht oder nur stark eingeschränkt ablaufen kann. Diese Mäuse weisen häufig neuronale Hyperplasien oder lymphoproliferative Defekte auf, die meist zum Tod im Embryonalstadium führen und durch die Akkumulation von Zellen verursacht werden, die normalerweise durch Apoptose sterben [Ranger, 2001; Zheng, 1999].

Im erwachsenen Organismus besteht ein stark reguliertes Gleichgewicht zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Um das Wachsen oder Schrumpfen von Geweben oder Organen zu verhindern, muß die Zahl der durch Zellteilung neu gebildeten Zellen durch Apoptose „alter“ Zellen ausgeglichen werden, so daß die Gesamtzellzahl konstant bleibt. Jede Sekunde werden im menschlichen Organismus ca. 100 000 Zellen durch Mitose neu produziert und ebenso viele Zellen sterben durch Apoptose. Zellen, die nur vorübergehend im Organismus benötigt werden, werden nach Erfüllen ihrer Funktion ebenfalls durch Apoptose eliminiert. Beispiele hierfür sind aktivierte Lymphozyten, extensive Apoptose von Mammaepithelzellen nach Beendigung der Milchproduktion oder der Verlust des Schwanzes einer Kaulquappe während der Umwandlung zum Frosch.

Zellen sind darüber hinaus in der Lage, über komplexe und z. T. noch unvollständig verstandene Mechanismen eigene Schäden zu erkennen. Sind diese so schwerwiegend, daß sie nicht durch Reparaturmechanismen beseitigt werden können, reagiert die Zelle durch Aktivierung

des Apoptose-Programms mit ihrer eigenen Vernichtung.

Apoptose spielt außerdem eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr Virus-infizierter, fremder oder transformierter Zellen. Zytotoxische T-Lymphozyten sind in der Lage, solche Zellen zu erkennen und spezifisch zu eliminieren. Dies geschieht v. a. durch die Sekretion hochspezialisierter Effektormoleküle, die in Zielzellen Apoptose auslösen (vgl. 1.3) [Barry, 2002; Russell, 2002; Trapani, 1999; Shresta, 1998; Atkinson, 1995].

Die Deregulation des Gleichgewichts zwischen Apoptose und Proliferation führt zu verschiedenen Krankheitsbildern [Thompson, 1995]: Eine zu hohe Apoptoserate bestimmter Zelltypen spielt eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen (z. B. Alzheimer; [Mattson, 2001]), Schlaganfall und Herzinfarkt [Elsasser, 2001; Gibson, 2001], AIDS [Roshal, 2001; Selliah, 2001; Gougeon, 1999] oder Autoimmunerkrankungen. Eine zu niedrige Apoptoserate ist ebenfalls beteiligt an einigen Autoimmunerkrankungen und vor allem an Krebs. Die erworbene Fähigkeit von Zellen, Signalen, die normalerweise zur Induktion von Apoptose führen, zu entgehen, ist ein charakteristisches Merkmal von Tumorzellen (vgl. 1.4) [Hanahan, 2000].

### ***Morphologische Veränderungen während Apoptose***

Der Begriff Apoptose wurde ursprünglich definiert anhand der charakteristischen morphologischen Veränderungen, die in sterbenden Zellen beobachtet und nach wie vor auch zum Nachweis von Apoptose herangezogen werden (Übersicht: [Zornig, 2001; Strasser, 2000]).

Das Gesamt-Zellvolumen nimmt ab, wodurch der Kontakt zu Nachbarzellen verloren geht. In Kultur nehmen adhärente Zellen eine kugelförmige Gestalt an und lösen sich vom Kultursubstrat. Diese Veränderungen gehen zurück auf eine Umorganisation und späteren Abbau des Zytoskeletts. Die Zellorganellen bleiben bei diesem Schrumpfungsprozeß jedoch weitgehend unverändert [Wyllie, 1980], so daß sich der Zellinhalt verdichtet. Die Zellmembran bleibt ebenfalls zunächst intakt, so daß Vital-Farbstoffe von früh-apoptotischen Zellen ausgeschlossen werden. Besonders auffallende Veränderungen sind im Zellkern zu beobachten: Das Chromatin kondensiert zu einer oder mehreren dichten Strukturen, die sich entlang der Kernmembran anordnen. Verschiedene Endonukleasen, die im Verlauf von Apoptose aktiviert werden, spalten die DNA zunächst in 300 bis 50 kb Fragmente und schließlich zwischen einzelnen Nukleosomen in 180 bp Fragmente. Diese Oligonukleosomen lassen sich durch Agarose-Gelelektrophorese in die charakteristische DNA-Leiter auftrennen. Das Volumen des Zellkerns nimmt wie das der gesamten Zelle ab, und schließlich zerfällt der Zellkern in mehrere Fragmente [Wyllie, 1980]. In spät-apoptotischen Zellen erfolgt die Ausbildung charakteristischer Blasen auf der Plasmamembran, und es schnüren sich Membran-umschlossene Zellfragmente ab, die als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden und als Teile des Zellinhalts ganze Organellen, Kernfragmente oder nur Zytoplasma enthalten. Der beschriebene Übergang von einer normalen zu einer geschrumpften, blasenbildenden Zelle erfolgt sehr schnell, typischerweise innerhalb von 10 bis 30 Minuten oder weniger Stunden.

*In vivo* werden apoptotische Zellen in diesem Stadium wahrscheinlich von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert. Verschiedene Zelloberflächenmoleküle auf apoptotischen Zellen kennzeichnen diese für Phagozytose [Brown, 2002; Chimini, 2002]. Eines dieser Moleküle wird häufig zum Nachweis von Apoptose verwendet: Während in der Zellmembran von normalen, nicht-apoptotischen Zellen eine Ungleichverteilung von Phosphatidylserin besteht, das nur an der Membran-Innenseite vorhanden ist, findet als frühes Ereignis während Apoptose die Einstellung eines Gleichgewichts statt, so daß Phosphatidylserin auch auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen nachweisbar ist [Gleiss, 2002].

## 1.2 Molekulare Mechanismen des apoptotischen Zelltods

Apoptose ist die auf molekularer Ebene am besten verstandene Form des programmierten Zelltods. Genetische und biochemische Untersuchungen haben einen Großteil der Effektor-mechanismen offengelegt, aber die Details der Signalwege, die Apoptose initiieren können, sind z. T. noch immer nur unvollständig bekannt.

Die zentrale Maschinerie des apoptotischen Zelltodprogramms ist konserviert von Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) über Fliegen (*Drosophila melanogaster*) bis zum Mensch; einzelne Komponenten sind zwischen verschiedenen Organismen funktionell austauschbar [Vaux, 1992].

Im Folgenden sind die Signalwege und deren Komponenten, die im menschlichen Organismus Apoptose auslösen und ausführen, beschrieben.

### 1.2.1 Molekulare Effektoren – Die Familie der Caspasen

Der Nematode *C. elegans* stellt ein hervorragendes Modellsystem zum Studium des programmierten Zelltods dar. Von den 1090 somatischen Zellen, die während der Entwicklung des Wurms gebildet werden, sterben genau 131 in voraussagbarer Weise kurz nach ihrer Entstehung [Driscoll, 1992]. Genetische Untersuchungen von Mutanten, in denen dieser Vorgang gestört ist, führten 1982 zur Entdeckung des *ced-3* Gens (für **cell death abnormal**), das alle somatischen Zelltod-Vorgänge kontrolliert: Das Fehlen von funktionellem Ced-3 Protein verhindert den Tod aller 131 Zellen vollständig [Horvitz, 1983]. Die Sequenzierung von *ced-3* ermöglichte die Identifizierung von Säugerhomologen: Caspase-1, die kurz zuvor als „pro-IL-1 $\beta$  converting enzyme“ (ICE) entdeckt (1989) und kloniert (1992) worden war, ist verwandt mit dem Zelltod-Protein Ced-3 aus *C. elegans* [Yuan, 1993]. In der Folgezeit wurden schnell weitere Homologe identifiziert; gegenwärtig sind 14 Mitglieder der Familie der Caspasen in Säugern bekannt, davon 11 humane Caspasen.

Caspasen sind **Cysteinyl-Aspartasen**, d. h. Cystein Proteasen mit Substratspezifität für Aspartat Reste (Übersicht: [Shi, 2002; Stennicke, 2000; Nicholson, 1999; Thornberry, 1999; Thornberry, 1998]). Sie sind die essentiellen Effektoren des apoptotischen Zelltodprogramms und für die meisten morphologischen Veränderungen verantwortlich. Zellen, die keine Effektor-Caspase-3 (vgl. unten) exprimieren, zeigen z. B. weder Blasenbildung der Zellmembran noch DNA- und Kern-Fragmentierung [Janicke, 1998; Slee, 2001]. Die transgene Expression von Caspase-Inhibitoren oder Mutationen in Caspase-Genen führen *in vivo* zum Überleben von Zellen, die sonst entwicklungsbedingten programmierten Zelltod sterben [Bump, 1995; Kuida, 1996; Woo, 1998; Hakem, 1998; Kuida, 1998]. Zelllinien in Kultur können ebenfalls durch Caspase-Inhibitoren gegen Apoptose-auslösende Signale geschützt werden [Thornberry, 1998]. Nach gegenwärtigem Verständnis laufen die verschiedenen Apoptose Signalwege in der Aktivierung von Caspasen zusammen, die dann das Zelltodprogramm ausführen. Caspasen-unabhängige Formen von Apoptose wurden z. T. in Modellsystemen beobachtet, die physiologische Bedeutung *in vivo* ist jedoch noch unklar bzw. umstritten [Huang, 2000a; Borner, 1999].

Caspasen werden konstitutiv in allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind im Zytoplasma sowie z. T. in den Mitochondrien und im ER vorhanden [Shikama, 2001; Zhivotovsky, 1999]. Wie alle Proteasen werden sie jedoch als inaktive Proenzyme synthetisiert, die durch gezielte Proteolyse aktiviert werden müssen. Procaspasen bestehen aus einer Prodomäne mit variabler Länge und unterschiedlicher Funktion sowie aus zwei Untereinheiten, die eine molare Masse von ca. 20 und 10 kDa besitzen. Die Aktivierung von Procaspasen erfolgt durch proteolytische Spaltung zwischen den Untereinheiten. Kristallstrukturen von Caspase-1, 3, 7 und 8 zeigen, daß die enzymatisch aktive Form als Tetramer (p20p10)<sub>2</sub> mit zwei katalytisch aktiven Zentren vorliegt (Übersicht: [Shi, 2002; Grutter, 2000]).



Aktive Caspasen gehören zu den Proteasen, die Substrate mit höchster Selektivität spalten, und zeichnen sich aus durch eine einzigartige Substratspezifität für Aspartat-Reste. Die einzige bisher bekannte Protease in Säugern, die ebenfalls selektiv nach Aspartat oder sauren Aminosäuren spaltet, ist die Serin-Protease Granzym B [Darmon, 1995; Thornberry, 1997], die von zytotoxischen Zellen im Rahmen einer Immunreaktion sekretiert wird (vgl. 1.3). Die Verwendung von Cystein-Resten im aktiven Zentrum als Nukleophil für die Spaltung von Peptidbindungen kommt dagegen auch bei anderen Protease-Familien vor.

Die proteolytische Aktivierung von Caspasen, d. h. die Spaltung zwischen den Untereinheiten erfolgt selbst nach Aspartat-Resten, so daß Caspasen sich gegenseitig aktivieren können, was die Existenz einer proteolytischen Kaskade impliziert. Die Idee einer Caspasen-Kaskade, die zu einer vielfältigen Amplifikation des Signals führt, liefert eine Erklärung für das sehr schnelle Ablaufen des apoptotischen Zelltods [Strasser, 1999].

Nach ihrer biologischen Funktion lassen sich die Mitglieder der Caspasen-Familie in drei Gruppen einteilen: ICE-artige Caspasen sind wie Caspase-1 / ICE an der Aktivierung von Zytokinen beteiligt und spielen eine Rolle bei Entzündungsprozessen [Martinon, 2002], offenbar jedoch nicht bei Apoptose. Dazu zählen Caspase-1, 4, 5 und 11. Eine neue Arbeit berichtet jedoch auch die Aktivierung von Caspase-1 infolge von apoptotischen Stimuli [Marsden, 2002]. Ced-3-artige Caspasen sind für Apoptose relevant und können nochmals in Initiatoren (Caspase-2, 8, 9, 10) und Effektoren (Caspase-3, 6, 7) unterteilt werden. Initiator- und Effektor-Caspasen unterscheiden sich in der Struktur der N-terminalen Propeptide. Während Effektor-Caspase-3, 6 und 7 sehr kurze Prodomänen besitzen, deren Funktion bisher weitgehend unbekannt ist (vgl. 1.2.2 Heteroaktivierung von Caspasen), sind die Prodomänen von Initiator-Caspase-2, 8, 9 und 10 relativ lang und enthalten Sequenzen für Protein-Protein Interaktionen (vgl. 1.2.2).

Caspasen verfügen über intrinsische enzymatische Aktivität [Roy, 2001], die wichtig für die Aktivierung der Caspasen-Kaskade ist: Initiator-Caspasen werden aktiviert, indem sie sich selbst spalten und aktivieren. Für diesen Vorgang wird ein Mechanismus der induzierten räumlichen Nähe angenommen („induced proximity model“ [Salvesen, 1999]). Vermittelt durch spezifische Adaptor-Proteine oligomerisieren Procaspasen und sind in den resultierenden Multiproteinkomplexen in der Lage, sich gegenseitig proteolytisch zu aktivieren (vgl. 1.2.2).

### ***Caspasen Substrate***

Die Spaltung und Aktivierung von Effektor-Caspasen wird als das finale und determinierende Ereignis im Verlauf der Apoptose-Signalkaskade angesehen. Während Initiator-Caspasen an der Signalleitung beteiligt sind und andere Caspasen aktivieren, sind aktivierte Effektor-Caspasen für die Ausführung von Apoptose verantwortlich und spalten zelluläre Substrate, was letztlich zum apoptotischen Phänotyp der Zelle führt. Nach Schätzungen basierend auf 2D-Gelelektrophorese von Zellextrakten apoptotischer und nicht-apoptotischer Zellen werden ca. 400 zelluläre Proteine von Caspasen gespalten, wobei davon ausgegangen werden kann, daß nicht alle Zielproteine konservierte Caspasen-Substrate darstellen, sondern daß einige Proteine auch quasi „zufällig“ eine Caspasen-Spaltsequenz besitzen, deren Proteolyse jedoch für Apoptose nicht relevant ist [Martin, 2003]. Bisher wurden 220 Caspasen-Substrate beschrieben [Martin, 2003; Utz, 2000; Nicholson, 1999]. Dazu gehören Strukturproteine (z. B. Aktin, Lamin A und B, Gas 2, Gelsolin, Fodrin,  $\beta$ -Catenin), Kinasen (PKC  $\delta$ , MEKK-1, Wee-1, Akt-1, FAK), Transkriptions- und Translationsfaktoren (SREBPs, hnRNPs, U1-70 kDa, snRNP, STAT-1, NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B- $\alpha$ , Sp-1), Proteine, die an DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrolle beteiligt sind (PARP, DNA-PKcs, pRb, NuMA, Mdm-2, cdc27) sowie Apoptose-Regulatoren (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub>, Bid, XIAP). Bisher wurde jedoch kein Schlüsselprotein identifiziert, dessen Spaltung durch Caspasen das ausschlaggebende Todesereignis darstellt.

Apoptotischer Zelltod wird dagegen offenbar durch Spaltung verschiedener zellulärer Proteine bewirkt, indem homöostatische und Reparaturprozesse sowie das Fortschreiten des Zellzyklus verhindert, Apoptose-Inhibitoren inaktiviert, der strukturelle Abbau und morphologische Veränderungen der Zelle eingeleitet werden und die sterbende Zelle für Phagozytose markiert wird.

Die Aktivierung von Caspase-3 hat für den Ablauf von Apoptose offensichtlich besondere Bedeutung. *In vitro* Experimente zeigen, daß Caspase-3, nicht jedoch Caspase-6 und 7 für die Spaltung der meisten untersuchten Substrate notwendig ist [Slee, 2001]. Lediglich PARP wird in Abwesenheit von Caspase-3 durch Caspase-7 gespalten; für die Spaltung von Lamin A ist Caspase-6 erforderlich [Slee, 2001]. Entsprechend ist Caspase-3 für die meisten charakteristischen Veränderungen in apoptotischen Zellen verantwortlich. Zellen von Caspase-3<sup>-/-</sup> Mäusen oder MCF-7 Zellen, die keine funktionale Caspase-3 exprimieren, zeigen nach verschiedenen apoptotischen Stimuli weder DNA-Degradierung und Kernkondensation noch Blasenbildung auf der Zellmembran [Janicke, 1998; Woo, 1998; Zheng, 1998] (Übersicht: [Zheng, 1999]).

Obwohl viele Caspasen-Substrate plausible Effektormoleküle für Apoptose darstellen, ist nach wie vor größtenteils unklar, wie genau die Spaltung von Substraten die charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen bewirkt. Für die folgenden Beispiele konnte ein direkter Zusammenhang zwischen Substratspaltung und morphologischem Effekt hergestellt werden: Die Fragmentierung der zellulären DNA während Apoptose wird vermittelt durch die Aktivierung des „DNA fragmentation factor“ (DFF), einem heterodimeren Proteinkomplex, der aus der Endonuklease DFF40/CAD (caspase activated DNase) und DFF45/ICAD (inhibitor of CAD) besteht [Enari, 1998; Sakahira, 1998]. DFF45/ICAD dient als spezifisches Chaperon während der Synthese von CAD und liegt in nicht-apoptotischen Zellen gebunden an CAD vor, wodurch die Nuklease-Aktivität von CAD inhibiert ist. Caspase-3 spaltet ICAD/DFF45, was zur Freisetzung von CAD aus dem Komplex führt. Die aktive Nuklease gelangt nun in den Zellkern und spaltet dort chromosomale DNA. Zellen, die kein ICAD oder nicht spaltbare Mutanten von ICAD exprimieren, zeigen keine DNA-Fragmentierung, obwohl andere charakteristische Apoptose-Merkmale beobachtet werden und die Zellen sterben [Enari, 1998; Sakahira, 1998] (Übersicht: [Nagata, 2000]). Ein Kernprotein, Acinus (apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus), das nach proteolytischer Aktivierung durch Caspase-3 Chromatin-Kondensation induziert, konnte ebenfalls identifiziert werden [Sahara, 1999]. Für die charakteristische Blasenbildung auf der Zellmembran ist die Kinase „p21-activated protein kinase 2“ (PAK2) verantwortlich, die durch Abspaltung eines regulatorischen Peptids von Caspase-3 aktiviert wird [Rudel, 1997].

## 1.2.2 Signale und Signalleitung

Eine Vielzahl verschiedener Signale kann zur Induktion von Apoptose in Zellen führen (Übersicht: [Zornig, 2001; Strasser, 2000]). Entwicklungsbedingte Apoptose wird meist auf Ebene der Transkription initiiert. Allgemein ist das Überleben jeder Zelle abhängig von Überlebensfaktoren, d. h. jede Zelle stirbt, wenn sie nicht aus ihrer Umgebung Signale erhält, die das Anschalten des apoptotischen Zelltodprogramms verhindern [Ishizaki, 1995]). Darüber hinaus wird Apoptose initiiert infolge von zellulärem Streß wie Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, fehlendem Zell-Matrix-Kontakt, DNA-Schäden oder dem Einwirken zytotoxischer Substanzen, die die normalen Lebensfunktionen der Zelle blockieren. Im Fall von DNA-Schäden erfolgt die Induktion von Apoptose über p53; wie genau die anderen Streß-Signale zur Aktivierung von Caspasen führen, ist dagegen noch weitgehend unbekannt.

Daneben kann eine Zelle direkte Todessignale aus der Umgebung erhalten, die über Membranrezeptoren unmittelbar die Aktivierung von Caspasen bewirken und apoptotischen

Zelltod initiieren (s. u.) (Übersicht: [Sartorius, 2001]).

Zytotoxische Zellen des Immunsystems verfügen neben Liganden für solche Rezeptoren über einen weiteren Mechanismus, um Apoptose in Virus-infizierten, körperfremden oder transformierten Zellen auszulösen: In sogenannten zytotoxischen Vesikeln sind verschiedene Serin-Proteasen (Granzyme) sowie das porenbildende Protein Perforin enthalten, die nach Kontakt mit einer Zielzelle sekretiert werden und nach Eindringen in die Zelle Apoptose auslösen (vgl. 1.3; [Barry, 2002]).

Für die Aktivierung apikaler Caspasen sind damit drei unterschiedliche Mechanismen bekannt, die je nach Ursprung des apoptotischen Signals von außen oder innerhalb der Zelle in extrinsische oder intrinsische Wege unterteilt werden. Zu den extrinsischen Wegen zählen die Aktivierung von Todesrezeptoren sowie die Sekretion von Granzym B. Der intrinsische Weg wird aktiviert infolge von zellulärem Streß, wobei die Freisetzung von v. a. Cytochrom c, aber auch anderer Proteine (Smac/DIABLO, AIF etc.) aus den Mitochondrien eine besondere Rolle spielt (vgl. unten).

### ***Der Todesrezeptor-Signalweg***

Einer der am besten untersuchten Signalwege, die zur Induktion von Apoptose führen, wird initiiert durch die Liganden-induzierte Aktivierung von Mitgliedern der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptor Superfamilie (Übersicht: [Locksley, 2001; Zornig, 2001; Strasser, 2000]). Je nach Zelltyp und Kontext können jedoch durch Aktivierung von Rezeptoren dieser Superfamilie eine Vielzahl zellulärer Antworten hervorgerufen werden. Neben der Induktion von Apoptose gehören dazu auch (T-Zell) Aktivierung, Proliferation, Differenzierung oder die Induktion von Überlebens-Signalwegen. Eine Unterfamilie der TNF Rezeptoren, die nach Aktivierung Apoptose auslösen können, besitzt eine gemeinsame intrazelluläre Domäne, die sogenannte „death domain“ (DD) und wird daher auch als Todesrezeptoren bezeichnet. Dazu gehören TNF-R1, CD95/Fas, DR (death receptor) 3, DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2 und DR6.

Die Liganden dieser Rezeptoren gehören ebenfalls zu einer Familie verwandter Proteine und werden als Typ II Membran-assoziierte Proteine synthetisiert, die als lösliche Liganden abgespalten werden können. Meist sind diese Liganden jedoch als trimere oder oligomere Proteine an Zellmembranen gebunden, und ihre Funktion besteht wahrscheinlich darin, Aggregation der entsprechenden Rezeptoren zu induzieren. Neue Daten weisen allerdings darauf hin, daß TNF-R1, TNF-R2 und CD95 evtl. bereits vor Ligandenbindung als trimere Komplexe vorliegen [Chan, 2000]. Liganden der Todesrezeptoren sind TNF $\alpha$ , CD95 Ligand / Fas Ligand sowie Trail.

Mit dem TNF Rezeptor ist ein relativ komplexes System von Signalwegen verbunden, da Aktivierung durch TNF je nach Kontext entweder Apoptose [Sartorius, 2001] oder über einen antagonistischen, NF- $\kappa$ B-vermittelten Signalweg das Überleben der Zelle bewirken kann [Karin, 2002]. Aktivierung von CD95/Fas durch CD95/Fas Ligand oder, in Zellkulturen, durch agonistische Antikörper stellt dagegen meist ein Todessignal dar [Krammer, 2000]. Sehr gut untersucht ist die physiologische Bedeutung von CD95 für das Immunsystem: CD95/CD95 Ligand sind beteiligt an der Eliminierung aktivierter peripherer T-Zellen am Ende einer Immunreaktion, an der zytotoxischen Immunabwehr Virus-infizierter oder transformierter Zellen, der Induktion von Apoptose in B-Zellen und der Eliminierung von inflammatorischen Zellen in immunprivilegierten Geweben [Krammer, 2000]. Über die normale biologische Funktion von Trail ist bisher nur wenig bekannt; interessanterweise löst Trail jedoch selektiv in vielen Tumorzelllinien sowie in primären Tumorzellen Apoptose aus (vgl. 1.4.2) [Ashkenazi, 2002].

Rezeptoren der CD95/TNF-Rezeptor Familie verfügen über keine katalytische Aktivität, die Signalleitung erfolgt vielmehr über Ausbildung eines „death-inducing signalling complex“

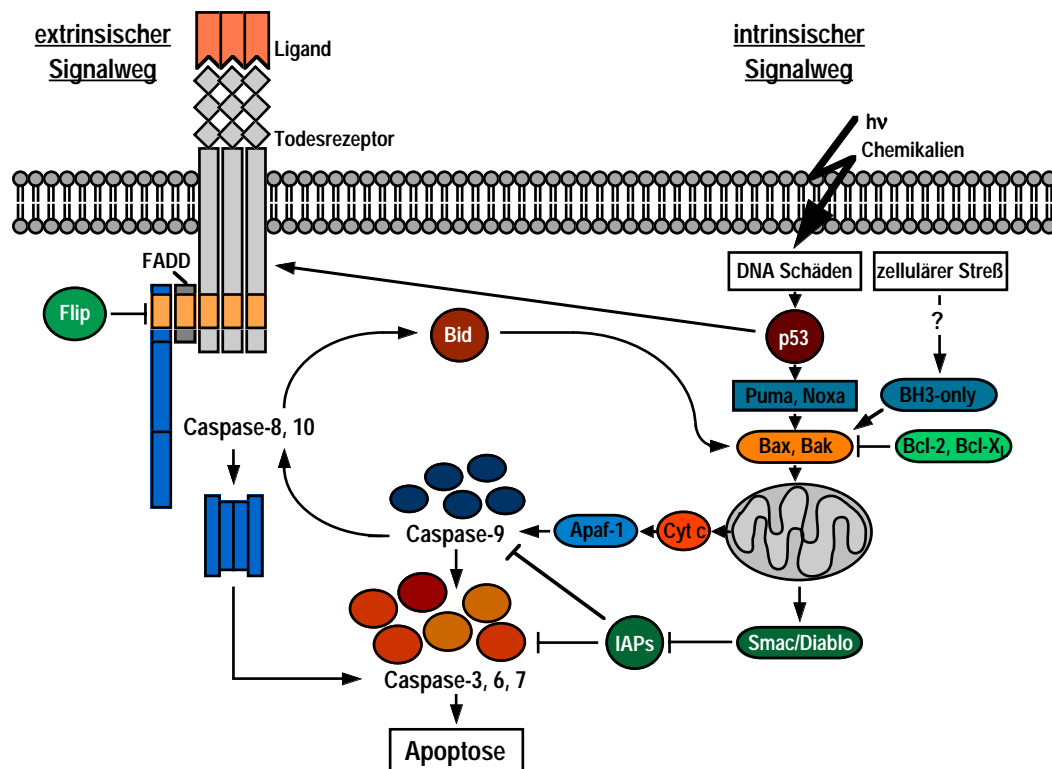
(DISC) am Rezeptor, in dem Initiator-Caspase-8 und wahrscheinlich Caspase-10 direkt aktiviert werden [Kischkel, 1995; Locksley, 2001].

Bindung von trimere CD95 Ligand an CD95 führt zur Trimerisierung des Rezeptors und Interaktion der „death domains“ innerhalb der Rezeptor-Oligomere [Huang, 1996]. Ein Adaptorprotein FADD (**F**as-associated protein with **d**eath **d**omain) / MORT1 besitzt ebenfalls eine „death domain“ und bindet an die „death domains“ des aktivierten Rezeptorkomplexes. FADD enthält darüber hinaus eine sogenannte „death effector domain“ (DED), die auch in der Prodomäne von Caspase-8 und 10 vorkommt, so daß FADD über die DED Procaspase-8 an den Rezeptor-Komplex rekrutiert [Boldin, 1996; Muzio, 1996]. Während ursprünglich ein Modell der induzierten räumlichen Nähe für die Aktivierung von Caspase-8 im DISC vorgeschlagen wurde („induced proximity model“ [Salvesen, 1999]), nach dem die im Rezeptor-Komplex gebundenen Caspase-8 Moleküle als Oligomere in enger räumlicher Nähe zueinander in der Lage sind, sich gegenseitig proteolytisch zu aktivieren, deuten neue Daten darauf hin, daß für die Aktivierung von Caspase-8 und 10 im DISC die Dimerisierung der entscheidende Faktor ist, die eine aktive Konformation der Proteasen induziert. Durch Spaltung wird diese Konformation lediglich fixiert, ist jedoch für die enzymatische Aktivität nicht zwingend erforderlich [Donepudi, 2003; Boatright, 2003]. Aktive Caspase-8 kann nach Abspaltung der Prodomäne aus dem Komplex freigesetzt werden und andere Effektor-Caspasen, v. a. Caspase-3 aktivieren. Die Ausbildung des DISC stellt damit eine direkte Verbindung zwischen extrazellulären Apoptose-Signalen und der zentralen Effektormaschinerie von apoptotischem Zelltod dar.

Für einige Zelltypen wurde ein davon abweichender Mechanismus beschrieben, dessen Relevanz *in vivo* jedoch umstritten ist [Scaffidi, 1998; Huang, 2000b; Schmitz, 2000]. In sogenannten Typ II Zellen führt die Aktivierung von CD95 durch CD95 Ligand nur ineffektiv zur Ausbildung des DISC, so daß nur wenig Caspase-8 aktiviert wird. Diese ist offenbar nicht ausreichend, um Effektor-Caspasen zu spalten, bewirkt jedoch die proteolytische Aktivierung von Bid, einem „BH3 domain-only“ Protein der Bcl-2 Familie (vgl. 1.2.3). Das C-terminale Bid-Fragment wandert zu den Mitochondrien und induziert über die Aktivierung der pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bax und Bak die Freisetzung von Cytochrom c sowie weiterer Proteine wie Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum der Mitochondrien (vgl. 1.2.3). Die Freisetzung von Cytochrom c führt zur Bildung des Apoptosoms, Aktivierung von Caspase-9 und nachfolgender Aktivierung von Effektor-Caspasen durch Caspase-9 (siehe unten). Dieser CD95-induzierte Apoptoseweg kann durch Bcl-2 (1.2.3) gehemmt werden, wogegen Bcl-2 den „klassischen“ Signalweg in Typ I Zellen nicht beeinflußt [Scaffidi, 1998].

Die Signalleitung über den TNF-Rezeptor erfolgt wie im Fall von CD95 durch Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase-8 an den oligomeren Rezeptor. FADD bindet jedoch nicht direkt an TNF-R1, sondern interagiert mit der „death domain“ eines weiteren Adaptorproteins TRADD (TNF receptor-associated protein with **d**eath **d**omain). TRADD dient als Adaptor für die Bindung verschiedener Proteine an den aktivierten Rezeptorkomplex, die unterschiedliche Signale leiten: während FADD wie beschrieben die Induktion von Apoptose vermittelt, stimulieren TRAF2 (TNF-R associated factor 2) sowie RIP (receptor-interacting protein) Signalwege, die zur Aktivierung der Jun N-terminalen Kinase (JNK) sowie der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 führen und als Überlebenssignale wirken (Übersicht: [Locksley, 2001]).

Trail induziert Apoptose durch Stimulierung der beiden Trail Rezeptoren DR4 und DR5. Wie für CD95 beschrieben, wird Procaspase-8 über FADD an trimere Trail-Rezeptoren gebunden und im Rezeptor-Komplex aktiviert. Drei weitere Trail Rezeptoren DcR1, 2 und 3 enthalten keine funktionale „death domain“ und können daher keine pro-apoptotischen Signale leiten, sondern wirken als „decoy“ Rezeptoren [Ashkenazi, 2002].



**Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalwegs.** Der extrinsische Signalweg wird aktiviert durch Liganden-induzierte Oligomerisierung von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor Familie, die zur Ausbildung des DISC am Rezeptor und Aktivierung von Caspase-8 führt, die dann ihrerseits Effektor-Caspasen aktiviert. In sog. Typ II Zellen spaltet Caspase-8 das „BH3-only“ Protein Bid, das durch Interaktion mit Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien bewirkt. Intrinsische Apoptose-Signale, die durch zellulären Stress ausgelöst werden, führen ebenfalls über Aktivierung von „BH3-only“ Proteinen und unter Beteiligung von Bax und Bak zur Freisetzung von Cytochrom c, das im Zytoplasma als Cofaktor für Apaf-1 fungiert. In Gegenwart von Cytochrom c bildet Apaf-1 einen multimeren Komplex mit Caspase-9, das Apoptosom, in dem Caspase-9 Effektor-Caspasen proteolytisch aktiviert, die dann apoptotischen Zelltod auslösen. Weitere Erklärungen im Text.

### Der intrinsische Signalweg – Apoptosom

Ein zweiter, sogenannter intrinsischer Signalweg zur Aktivierung von Caspasen wird initiiert infolge von zellulärem Stress (s. o.). Wie zuvor beschrieben kann dieser Signalweg auch über Todesrezeptoren in sog. Typ II Zellen aktiviert werden. Er verläuft unter Beteiligung der Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma und wird daher auch als mitochondrialer Signalweg bezeichnet. Die Bedeutung der Mitochondrien für die Initiation von Apoptose über diesen Signalweg ist jedoch umstritten. Ob die Veränderungen in den Mitochondrien und Freisetzung von Cytochrom c diesen Weg initiieren oder als nachgeordnete Amplifikationsschritte zu sehen sind, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen [Green, 1998; Finkel, 2001; Marsden, 2002]. Da dieser Signalweg im Gegensatz zu dem Todesrezeptor-Signalweg in Typ I Zellen durch Bcl-2 reguliert wird, wurde alternativ die Bezeichnung „Bcl-2 hemmbarer Signalweg“ vorgeschlagen [Bouillet, 2002].

Wie im Fall des „death inducing signalling complex“ an Todesrezeptoren bildet sich im Zytoplasma in Gegenwart von Cytochrom c ein Caspasen-Aktivierungskomplex (Übersicht:

[Cain, 2002]), in dem Caspase-9 durch Bindung an den spezifischen Cofaktor „apoptotic protease activating factor“ Apaf-1 aktiviert wird [Zou, 1997; Li, 1997; Hengartner, 1997]. Die Interaktion von Apaf-1 mit Caspase-9 wird vermittelt durch die „Caspase recruitment domain“ (CARD), die sowohl am N-Terminus von Apaf-1 als auch in der Prodomäne von Caspase-9 vorhanden ist. Neben der CARD Domäne enthält Apaf-1 eine Proteindomäne, die Homologie zum *C. elegans* Protein Ced-4 aufweist und ATPase Aktivität besitzt. Der Carboxy-Terminus von Apaf-1 besteht aus einer langen Domäne mit „WD40 repeats“, über die Protein-Protein Wechselwirkungen stattfinden [Zou, 1997]. Eine Cytochrom c Bindungsstelle wurde bisher jedoch nicht identifiziert. Während Apaf-1 in nicht-apoptotischen Zellen in einer geschlossenen Konformation vorliegt, in der die „WD40 repeats“ mit dem eigenen N-Terminus interagieren, führt die Bindung von Cytochrom c und dATP, das hydrolysiert wird, zu einer Konformationsänderung und nachfolgend zur Oligomerisierung von Apaf-1, das in diesem Zustand Procaspase-9 bindet. In diesem Caspase-9/Apaf-Komplex, der auch als Caspase-9 Holoenzym oder Apoptosom bezeichnet wird [Rodriguez, 1999; Zou, 1999], liegt Caspase-9 in einer Konformation vor, die enzymatische Aktivität und Spaltung von Substraten erlaubt. Anders als bei Caspase-8 wird jedoch die Prodomäne nicht abgespalten, so daß aktive Caspase-9 nicht aus dem Komplex dissoziiert [Stennicke, 2000]. Das Apoptosom wird daher als die eigentlich aktive Form von Caspase-9 angesehen, und die Spaltung von Caspase-9 zwischen den Untereinheiten ist für die Aktivierung nicht notwendig [Stennicke, 1999].

Das funktionale Apoptosom ist damit ein hochmolekularer multimerer Komplex mit einer molaren Masse von ca. 700 kDa, der neben Apaf-1, Caspase-9, Cytochrom c und dATP auch aktive Caspase-3 und, locker assoziiert, Caspase-7 enthält [Bratton, 2001; Cain, 1999]. Eine dreidimensionale Struktur des oligomeren Apaf-1/Cytochrom c/dATP-Komplexes wurde kürzlich veröffentlicht und zeigt, daß im Apoptosom sieben Apaf-1 Moleküle in einer Rad-ähnlichen Struktur angeordnet sind [Acehan, 2002].

### ***Hetero-Aktivierung von Effektor-Caspasen***

Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 besitzen keine Protein-Protein Interaktionsdomänen, über die sie an Proteinkomplexe rekrutiert werden können. Diese Caspasen werden daher durch aktivierte Initiator-Caspasen 8, 9 und 10 gespalten und aktiviert.

Während Initiator-Caspasen zwischen großer und kleiner Untereinheit spalten, ist für die Aktivierung von Effektor-Caspasen außerdem die Abspaltung der kurzen Prodomäne notwendig, die daher evtl. regulatorische Funktion besitzt. Caspase-3 entfernt ihre Prodomäne nach initialer Proteolyse durch Initiator-Caspasen autokatalytisch, so daß Caspase-3 über einen direkten Mechanismus schnell aktiviert werden kann [Han, 1997]. Die Expression rekombinanter Caspase-3 ohne Prodomäne führte zur spontanen Autoaktivierung [Meergans, 2000]. Für die Aktivierung von Caspase-7 wurde dagegen ein komplizierterer Mechanismus beschrieben [Yang, 1998]: Nach Spaltung zwischen großer und kleiner Untereinheit durch Initiator-Caspasen muß die Prodomäne durch aktive Caspase-3 entfernt werden.

Effektor-Caspasen werden damit normalerweise proteolytisch durch „upstream“ Caspasen aktiviert. Da dieser Schritt ein irreversibles Ereignis darstellt, kann die Aktivierung von Effektor-Caspasen als der Punkt in der Apoptose-Signalkaskade betrachtet werden, ab dem keine Umkehr mehr möglich ist. Initiator-Caspasen werden dagegen über regulierte Protein-Protein Wechselwirkungen aktiviert. Die detaillierten molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung von Caspasen beteiligt sind, sind nach wie vor nicht vollständig geklärt und wahrscheinlich wesentlich komplexer als hier dargestellt [Hengartner, 2000].

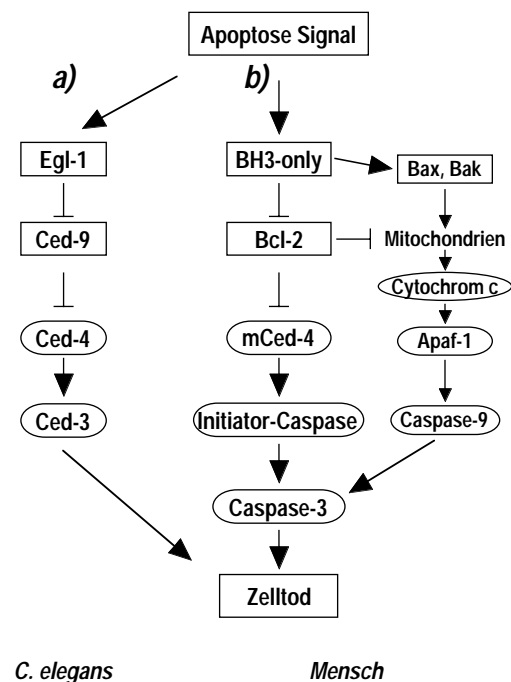
### 1.2.3 Regulatoren

#### *Die Familie der Bcl-2 Proteine*

Das erste Gen mit regulatorischem Einfluß auf Apoptose, das identifiziert wurde, war das Oncogen *bcl-2* (Übersicht: [Strasser, 1999]). Es wurde isoliert als eines der beiden Gene an der chromosomalen Bruchstelle der t(14;18) Translokation, die in den meisten humanen follikulären B-Zell Lymphomen vorkommt. Durch die Translokation steht das *bcl-2* Gen unter der Kontrolle des 5' Immunoglobulin heavy chain enhancer E $\mu$ , der in B-Zell Lymphomen sehr aktiv ist, so daß Bcl-2 stark überexprimiert wird. Anders als bereits bekannte Oncogene fördert Bcl-2 jedoch weder die Proliferation noch inhibiert es die Differenzierung von Zellen, sondern verhindert apoptotischen Zelltod [Vaux, 1988]. Zellen, die Bcl-2 überexprimieren, sind resistent gegenüber einer Vielzahl verschiedener apoptotischer Signale wie Entzug von Wachstumsfaktoren, DNA-Schäden, Ca<sup>2+</sup>-Ionophore, Phorbol ester oder Corticosteroiden [Strasser, 1999]. Andererseits weisen genetische Untersuchungen darauf hin, daß die meisten Zelltypen in Metazoen ein funktionales anti-apoptotisches Bcl-2 Protein zum Überleben benötigen [Cory, 2002]. Diese Beobachtungen zeigten, daß Bcl-2 eine zentrale Kontrollfunktion für das Überleben oder Sterben von Zellen besitzt. *In vivo* führt die Überexpression von Bcl-2 in Kombination mit der von c-Myc zur Bildung lymphoider Tumore [Strasser, 1990], was die Bedeutung der Blockierung von Apoptose für die Entstehung von Tumoren verdeutlicht (vgl. 1.4.1).

Sowohl die Funktion als auch die Struktur von Bcl-2 ist in Metazoen stark konserviert. Bcl-2 kann sein Homolog Ced-9 aus dem Nematoden *C. elegans* ohne Verlust der Funktion ersetzen [Vaux, 1992]. In Säugern stellt Bcl-2 den Prototyp einer Familie verwandter Proteine dar, die alle wenigstens eine konservierte „Bcl-2 homology region“ (BH) besitzen und die sich in drei Gruppen einteilen lassen (Übersicht: [Cory, 2002]): Bcl-2 und verschiedene sehr nahe Verwandte Bcl-x<sub>L</sub>, A1, Boo, Bcl-w, Mcl-1 sowie das *C. elegans* Homolog Ced-9 wirken anti-apoptotisch und weisen 3 oder 4 Regionen ausgeprägter Sequenzhomologie zu Bcl-2 auf (BH1-4). Die strukturell ähnlichen Proteine Bax, Bak, Bok und Bcl-x<sub>S</sub> wirken dagegen pro-apoptotisch und haben 3 Bcl-2-Homologie Regionen BH1-3. Ein *C. elegans* Homolog dieser Proteine ist bisher nicht bekannt. Eine weitere Gruppe von Proteinen, die nur die kurze 9 bis 16 Aminosäuren umfassende BH3 Domäne besitzt, sonst aber keine Homologie zu irgend einem anderen bekannten Protein aufweist, wirkt ebenfalls pro-apoptotisch. Zu diesen Proteinen, die daher als „BH3-only“ Proteine bezeichnet werden, gehören Bim, Bik, Bad, Bid, Hrk, Blk, Noxa, Puma, Bmf sowie das *C. elegans* Protein Egl-1. Die meisten Mitglieder der Bcl-2 Familie haben außerdem eine C-terminale Transmembran-Domäne, die diese Proteine auf der zytoplasmatischen Seite der Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und Zellkern verankert.

Wie die Bcl-2 Proteine biochemisch das Ablauf des Apoptoseprogramms infolge von zellulärem Streß regulieren, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Im Nematoden *C. elegans* verhindert das Bcl-2 Protein Ced-9 durch Interaktion mit dem Apaf-1 Homolog Ced-4 die Aktivierung der Caspase Ced-3 und damit die Initiation von Apoptose [Horvitz, 1999]. Der programmierte Tod aller 131 somatischen Zellen während der Embryonalentwicklung erfordert die Expression des „BH3-only“ Proteins Egl-1, das an Ced-9 bindet und dadurch die Inhibierung von Ced-4 durch Ced-9 aufhebt [Conradt, 1998], so daß die Caspase Ced-3 aktiviert werden und Apoptose stattfinden kann. In Abwesenheit von Ced-9 aktiviert Ced-4 dagegen die Caspase Ced-3 unabhängig von Egl-1.



**Abbildung 1.2 Vergleich der intrinsischen Signalwege im Nematoden *C. elegans* und im Menschen; Funktion der Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie.** In *C. elegans* erfolgt die Initiierung von Apoptose durch transkriptionelle Aktivierung des „BH3-only“ Proteins Egl-1, das mit dem Bcl-2 Homolog Ced-9 interagiert und dessen inhibitorische Wirkung auf das Apaf-1 Homolog Ced-4 aufhebt, so daß Ced-4 die Caspase Ced-3 aktivieren kann. Im Gegensatz dazu wurde im menschlichen Organismus ein Signalweg identifiziert, der unter Beteiligung der Mitochondrien verläuft: „BH3-only“ Proteine aktivieren Bax und Bak, die die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induzieren, oder interagieren mit Bcl-2 und blockieren so dessen Funktion, die Freisetzung von Cytochrom c zu verhindern. Zytoplasmatisches Cytochrom c ist die Voraussetzung für die Ausbildung des Apoptosoms und Aktivierung der Initiator-Caspase-9, die dann Effektor-Caspasen aktiviert. Ein zum Mechanismus in *C. elegans* analoger Signalweg wurde auch für den menschlichen Organismus postuliert, an dem ein noch nicht identifiziertes Apaf-1 Homolog mCed-4 sowie eine bisher unbekannte Initiator-Caspase beteiligt sein könnten.

Eine direkte Interaktion von Bcl-2 oder einem der anderen bekannten humanen Familienmitglieder mit Apaf-1 in Analogie zu diesem Signalweg konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [Hausmann, 2000; Moriishi, 1999].

Die Überexpression von Bcl-2 verhindert dagegen alle mitochondrialen Veränderungen, die normalerweise während Apoptose beobachtet werden, wie Abbau des pH Gradienten, Verlust des Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$ , Öffnung der „permeability transition (PT) pores“ und Freisetzung von Cytochrom c [Green, 1998]. Die Funktion der Bcl-2 Proteine wird daher v. a. in der Beeinflussung der Mitochondrien und Regulation der Freisetzung von Cytochrom c als Voraussetzung für die Bildung des Apoptosoms (1.2.2) gesehen, was vielfach als der Schlüsselschritt zur Initiierung von Apoptose betrachtet wird (Übersicht: [Wang, 2001b; Finkel, 2001]). Bcl-2 und seine anti-apoptotischen Homologe sind mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert und gewährleisten offenbar deren Integrität, indem sie die Freisetzung von Cytochrom c verhindern. Für die Induktion von Apoptose und Cytochrom c-Freisetzung sind sowohl Bax und Bak als auch „BH3-only“ Proteine notwendig [Bouillet, 2002; Cheng, 2001; Wei, 2001; Zong, 2001]. Bax und Bak werden durch Bindung des „BH3-only“ Proteins Bid (evtl. auch Bim) aktiviert, indem eine Konformationsänderung induziert wird, die zur Insertion (von Bax)



in die Mitochondrienmembran und Bildung von Bax bzw. Bak Aggregaten führt, was die Freisetzung von Cytochrom c über einen bisher nicht geklärten Mechanismus zur Folge hat [Wei, 2000] (Übersicht: [Cory, 2002]).

Die übrigen „BH3-only“ Proteine neutralisieren dagegen wahrscheinlich durch Bindung an Bcl-2 dessen anti-apoptotische Wirkung, wobei sie Bid aus dem Komplex mit Bcl-2 verdrängen [Letai, 2002]. Die Überexpression von Bcl-2 blockiert also offenbar die durch „BH3-only“ Proteine (Bid) vermittelte Induktion von Apoptose, indem Bid gebunden und so die Interaktion mit Bax/Bak verhindert wird. Die Aktivierung von Bad oder Blk wiederum verdrängt an Bcl-2 gebundenes Bid und erlaubt so die Freisetzung von Cytochrom c durch Bindung von Bid an Bax oder Bak.

Die verschiedenen „BH3-only“ Proteine dienen als Sensoren für unterschiedliche Apoptose Stimuli, d. h. je nach Art des Signals werden wahrscheinlich unterschiedliche „BH3-only“ Proteine aktiviert [Puthalakath, 2002]. Diese werden in nicht-apoptotischen Zellen auf Ebene der Transkription (p53 induzierte Expression von Noxa, Puma), über posttranslationale Modifizierung (Phosphorylierung von Bad), durch Bindung an Komponenten des Zytoskeletts (Bim, Bmf) oder in Form inaktiver Vorläufer reguliert, die proteolytisch aktiviert werden müssen (Spaltung von Bid durch Caspase-8) (Übersicht: [Bouillet, 2002]).

Ein alternatives Modell, nach dem „BH3-only“ Proteine an anti-apoptotische Bcl-2 Familienmitglieder binden und diese durch Konformationsänderung inaktivieren oder evtl. sogar durch Bindung eine pro-apoptotische Konformation induzieren, wurde beschrieben [Strasser, 2000]. Eine direkte Interaktion von Bcl-2 mit Bax oder Bak konnte dagegen nicht beobachtet werden [Mikhailov, 2001], d. h. anti-apoptotische Bcl-2 Proteine blockieren die Freisetzung von Cytochrom c durch pro-apoptotisches Bax oder Bak nicht direkt, sondern über einen indirekten Mechanismus (s. o.) [Cory, 2002].

In Analogie zu dem Mechanismus in *C. elegans* wurde ein weiteres Modell für die Funktionsweise von Bcl-2 vorgeschlagen, nach dem Bcl-2 mit einem bisher nicht identifizierten Apaf-1 Homolog interagiert und so die Aktivierung von Initiator-Caspasen unabhängig von Cytochrom c Freisetzung und Bildung des Apoptosoms reguliert [Marsden, 2002]. Nach diesem Modell stellen die Freisetzung von Cytochrom c und die durch Apaf-1 vermittelte Aktivierung von Caspase-9 einen Amplifikationsschritt dar, der in einigen Zelltypen essentiell ist, in anderen jedoch nicht.

### **Weitere Regulatoren: IAPs, Smac/DIABLO und virale Inhibitoren**

Während Bcl-2 Proteine die Aktivierung von (Initiator-) Caspasen kontrollieren, werden Caspasen selber durch verschiedene Prozesse reguliert, z. B. auf Ebene der Transkription oder durch posttranslationale Modifizierung [Earnshaw, 1999]. Die enzymatische Aktivität von Caspasen wird darüber hinaus kontrolliert durch die Familie der „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs). Diese umfaßt eine große Anzahl konservierter viraler und zellulärer Proteine, die ursprünglich in Bakulovirus identifiziert wurden als Faktoren, die Apoptose von Wirtszellen verhindern. Die zellulären Proteine XIAP (X chromosome-linked IAP), ML-IAP (melanoma inhibitor of apoptosis protein) / Livin, cIAP-1 und cIAP-2 blockieren Apoptose, indem sie direkt an Caspasen binden und diese inhibieren [Deveraux, 1999]. XIAP, der stärkste dieser Inhibitoren, bindet selektiv an eine der aktiven Formen von Caspase-9 (das p35/p12 Heterotetramer) und gleichzeitig an aktive Caspase-3 [Bratton, 2002] sowie an Caspase-7 *in vitro* [Suzuki, 2001a]. XIAP hemmt damit sowohl den Todesrezeptor- als auch den intrinsischen Signalweg, indem es Initiator-Caspase-9 wie auch Effektor-Caspasen inhibiert. XIAP sowie cIAP-2 fungieren darüber hinaus als Ubiquitin-Ligase und bewirken durch Ubiquitynylierung von gebundener Caspase-3 und 7 deren Abbau durch das Proteasom [Suzuki, 2001b; Huang, 2000c].

Ein weiteres regulatorisches Moleküle, das durch Einwirken von aktiviertem Bid aus dem Intermembranraum der Mitochondrien freigesetzt wird und das Caspasen-Aktivität beeinflusst, wurde kürzlich identifiziert: Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI) [Du, 2000; Verhagen, 2000; Verhagen, 2002] bindet an XIAP und hebt so dessen inhibitorische Wirkung auf Caspasen auf. Die Freisetzung von Smac wird wie die von Cytochrom c durch Bcl-2 inhibiert [Sun, 2002]. Die Bedeutung von Bid nach Aktivierung von CD95 in Typ II Zellen könnte damit nicht (nur) in der Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und Ausbildung des Apoptosoms zur Aktivierung von Caspasen bestehen, sondern auch in der Freisetzung von Smac/Diablo, das die Inhibierung aktiver Caspasen durch XIAP aufhebt [Sun, 2002; Green, 2000].

Da die Induktion von Apoptose als Abwehrstrategie gegen Viren und andere intrazelluläre Pathogene durch das Immunsystem dient, haben viele dieser Pathogene Mechanismen entwickelt, über die sie Apoptose der Wirtszellen verhindern und so die eigene Replikation gewährleisten. Zu den viralen Inhibitoren von Apoptose (Übersicht: [Zornig, 2001; Strasser, 2000; Ekert, 1999]) gehören Bcl-2 Homologe, Caspase Inhibitoren wie das Kuhpocken-Protein „cytokine response modifier A“ (CrmA) oder p35 aus Bakulovirus sowie „FLICE-inhibiting proteins“ (FLIP). Diese Proteine ähneln der Struktur von Caspase-8, die früher auch als FLICE bezeichnet wurde, und wirken daher als „decoy“ Enzyme. Anstelle von Caspase-8 werden FLIPs an aktivierte Todesrezeptoren rekrutiert und verhindern so die Ausbildung des DISC und Aktivierung von Caspase-8. Ein zelluläres vFLIP Homolog cFLIP existiert in zwei splice-Varianten und enthält zwei „death effector domains“ (DED) sowie im Fall von FLIP<sub>L</sub> eine inaktive Caspase-ähnliche Domäne, der jedoch das katalytisch aktive Cystein fehlt.

### 1.3 Induktion von Apoptose durch zytotoxische Lymphozyten

Zytotoxische Lymphozyten sind spezialisierte Zellen des Immunsystems, die einen hocheffizienten Schutzmechanismus des Organismus gegen intrazelluläre Pathogene, Virus-infizierte, transformierte oder körperfremde Zellen darstellen (Übersicht: [Russell, 2002]). Dazu gehören CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), „natürliche Killer“ (NK-) Zellen sowie Lymphokin-aktivierte Killer (LAK) -Zellen. Diese töten Zielzellen, indem sie Apoptose induzieren, wozu zwei voneinander unabhängige Mechanismen zur Verfügung stehen: Während die Aktivierung des Fas Todesrezeptor-Signalwegs durch Expression von Fas-Ligand wahrscheinlich ein relativ später Effekt von CTLs ist, spielt die Sekretion von Effektormolekülen aus sogenannten zytotoxischen Vesikeln die Hauptrolle bei der Induktion von Apoptose *in vitro*. Nach Kontakt eines zytotoxischen Lymphozyten mit einer Zielzelle ordnen sich die zytotoxischen Vesikel im Bereich der Kontaktstelle zwischen Zielzelle und Lymphozyt so an, daß der Inhalt zielgerichtet in die unmittelbare Umgebung der zu vernichtenden Zelle sekretiert wird [Stinchcombe, 2001].

#### 1.3.1 Effektormoleküle aus zytotoxischen Vesikeln

Als Hauptbestandteile sind in den zytotoxischen Vesikeln das porenbildende Protein Perforin (Pfn) sowie eine Familie von Serin-Proteasen enthalten, die als Granzyme bezeichnet werden und 90% der Gesamtmasse der Vesikel bilden. Für die zytotoxische Aktivität der Vesikel ist v. a. Granzym B (GrB) zusammen mit Perforin verantwortlich: Perforin-defiziente Lymphozyten können keine DNA-Fragmentierung und Apoptose in Zielzellen induzieren [Kagi, 1994; Kojima, 1994; Lowin, 1994; Walsh, 1994]. Granzym B-defiziente Lymphozyten verursachen zwar

DNA-Fragmentierung, aber nur mit starker zeitlicher Verzögerung im Vergleich zu wildtyp Zellen [Heusel, 1994; Shresta, 1995]), was der Aktivität von Granzym A zugeschrieben wird. Lymphozyten von Granzym A<sup>-/-</sup>/ Granzym B<sup>-/-</sup> Mäusen sind dagegen nicht mehr in der Lage, Apoptose zu initiieren [Simon, 1997].

Granzyme werden ausschließlich von aktivierten T-Lymphozyten, unreifen T-Zellen im Thymus,  $\gamma\delta$  T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Während NK-Zellen Granzyme konstitutiv exprimieren und speichern, produzieren T-Lymphozyten Granzyme erst ca. 12 bis 24 Stunden nach Stimulation durch Antigene. Bisher wurden Granzyme nur in Säugern identifiziert. In Mäusen wurden acht Granzyme GrA-G und GrM gefunden, im menschlichen Organismus sind fünf Granzyme (GrA,B,H,M sowie Trypsin-2 / Granzym-3) bekannt.

Granzyme werden als inaktive Zymogene synthetisiert, die ein Signalpeptid für die Sekretion sowie ein Aktivierungsdipeptid neben dem Polypeptid des aktiven, reifen Enzyms enthalten. Die enzymatisch aktive Form entsteht nach Abspaltung des aminoterminalen Dipeptids durch Dipeptidyl-Peptidase I / Cathepsin C [Simon, 1997; Caputo, 1993; Pham, 1999] während der Verpackung in zytotoxische Vesikel, die spezialisierte Formen sekretorischer Lysosomen darstellen. Granzyme werden damit als aktive Enzyme gespeichert und bei Bedarf sekretiert (Übersicht: [Trapani, 2001; Shresta, 1998]).

Neben Granzymen, Perforin und weiteren Molekülen enthalten die zytotoxischen Vesikel ein saures Chondroitinsulfat Proteoglycan, das auch als Serglycin bezeichnet wird. Serglycin dient dazu, die stark basischen Granzyme, die im sauren Milieu der lysosomalen Vesikel positiv geladen sind, zu komplexieren, und erleichtert so Verpackung und extrazellulären Transport der Proteasen. Granzym B-Chondroitinsulfat-Komplexe sind sehr stabil und stellen evtl. die physiologisch aktive Form von Granzym B dar [Metkar, 2002; Galvin, 1999].

### 1.3.2 Das porenbildende Protein Perforin

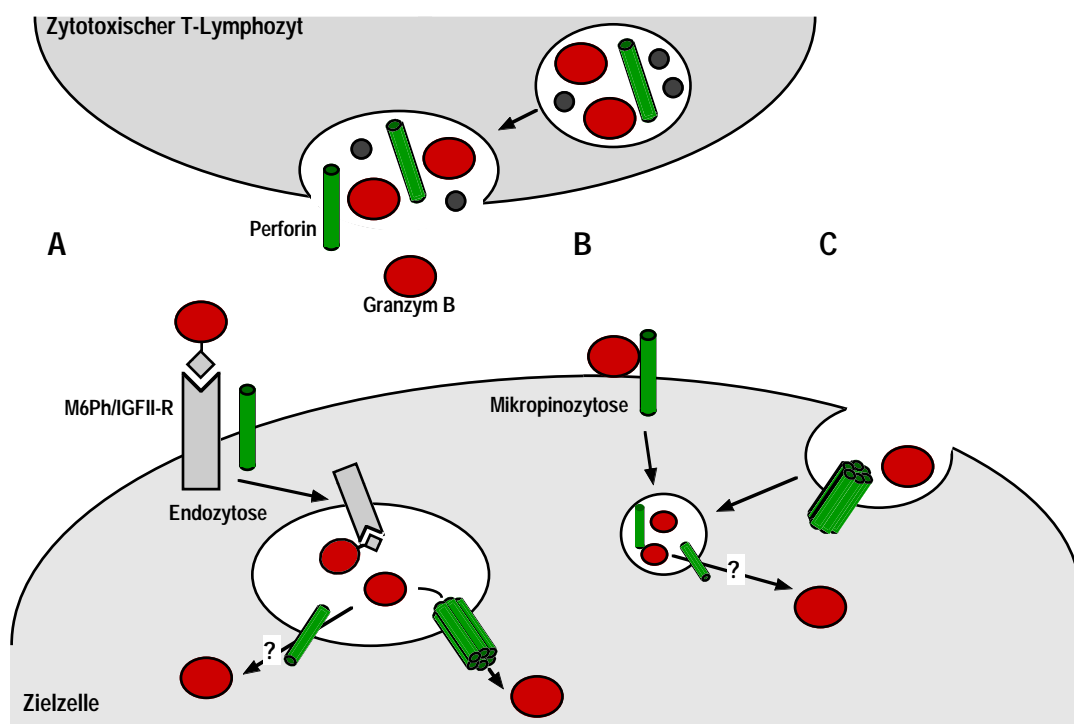
Für die durch Granzyme vermittelte Induktion von Apoptose ist Perforin absolut erforderlich (s. o.). Die genaue Funktionsweise von Perforin ist jedoch nach wie vor unklar (Übersicht: [Barry, 2002; Russell, 2002]). Offenbar erlaubt Perforin Granzymen den Zugang zu zellulären Substraten im Zytoplasma oder im Zellkern. Ursprünglich wurde angenommen, daß Perforin Ca<sup>2+</sup>-abhängige Poren in der Zellmembran von Zielzellen bildet, durch die Granzyme in die Zelle diffundieren. Für die Induktion von Apoptose durch Granzym B sind jedoch sublytische Perforin Konzentrationen ausreichend [Shi, 2000; Trapani, 1998], und neue Daten zeigen, daß Perforin oder evtl. auch Perforin-Chondroitinsulfat-Komplexe ohne nachweisbare Permeabilisierung der Zellmembran Granzym B-Serglycin-Komplexen das Eindringen ins Zytoplasma ermöglichen [Metkar, 2002]. Gegenwärtig geht man daher davon aus, daß Perforin auf Ebene der Endosomen wirkt und nach Rezeptor-vermittelter Endozytose von Granzym B (1.3.3) über Porenbildung oder einen anderen Mechanismus die Zerstörung der endosomalen Vesikel und Freisetzung von Granzym B ins Zytoplasma verursacht.

Für dieses Modell spricht auch die Tatsache, daß Perforin funktionell durch replikationsinkompetente Formen von Adenovirus [Froelich, 1996a] sowie verschiedene bakterielle Toxine [Browne, 1999] ersetzt werden kann.

### 1.3.3 Die Serin-Protease Granzym B

Die Serin-Protease Granzym B wird von zytotoxischen Lymphozyten sekretiert als stark glykosyliertes, reifes Enzym mit einer molaren Masse von ca. 30-65 kDa (im Vergleich zu 27 kDa für nicht-glykosyliertes Granzym B; [Caputo, 1993]). Wie Granzym A besitzt Granzym B

Mannose-6-Phosphat-Modifikationen, die die Verpackung in die lysosomalen sekretorischen Vesikel über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor-Weg ermöglichen [Griffiths, 1997; Griffiths, 1993]. Der Mannose-6-Phosphat / „insulin-like growth factor II“ (IGFII) Rezeptor wurde andererseits auch als ein Zelloberflächenrezeptor identifiziert, an den sekretiertes Granzym B bindet und über den es in Zielzellen aufgenommen werden kann [Motyka, 2000]. Nach Internalisierung von Granzym B über Rezeptor-vermittelte Endozytose liegt die Protease jedoch in Membranumschlossenen Vesikeln vor [Pinkoski, 1998; Shi, 1997], in denen ihre zytotoxische Aktivität quasi eingeschlossen ist. Die Induktion von apoptotischem Zelltod erfordert daher zusätzlich Perforin oder ein anderes endosomolytisches Agens [Froelich, 1996b; Browne, 1999], um Granzym B ins Zytoplasma freizusetzen, wo es Substrate spalten kann. Darüber hinaus wurde die Anreicherung von Granzym B im Zellkern nach Zugabe von Perforin zu den Zellen beschrieben [Trapani, 1998; Pinkoski, 2000]. Die Mikroinjektion von Granzym B direkt in das Zytoplasma von Zellen führt dagegen unmittelbar zur Induktion von Apoptose unabhängig von Perforin [Pinkoski, 1998]. In einer neuen Arbeit wurde neben der Aufnahme von Granzym B über einen spezifischen Rezeptor auch die Internalisierung von Granzym B in verschiedene Zelllinien über Mikropinozytose beschrieben [Trapani, 2003].



**Abbildung 1.3 Wege für die Aufnahme von Granzym B in Zielzellen.** A, Der Mannose-6-Phosphat / IGFII-Rezeptor wurde als ein Zelloberflächenrezeptor identifiziert, an den Granzym B bindet und über den es durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in Zellen aufgenommen werden kann [Motyka, 2000]. Perforin dient dabei als endosomolytisches Agens, um Granzym B ins Zytoplasma freizusetzen. B, Eine neue Publikation beschreibt die Internalisierung von Granzym B über Mikropinozytose [Trapani, 2003]. C, Alternativ wurde auch die Aufnahme von Granzym B infolge der Bildung von Perforin-Poren in der Zellmembran diskutiert, wobei das durch Perforin geschädigte Membransegment -zusammen mit gebundenem Granzym B- als Reparaturmechanismus internalisiert wird.

### **Substratspezifität – Spaltung von Caspasen**

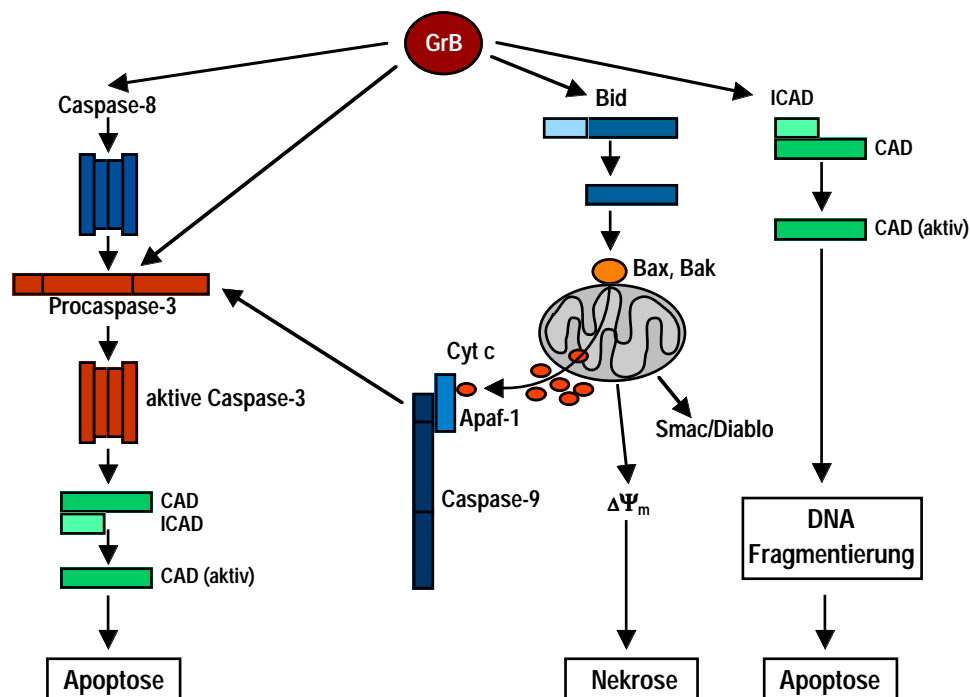
Die biochemische Funktion von Granzym B ergibt sich aus seiner Substratspezifität: Die Serin-Protease ist das einzige bisher bekannte Enzym, das wie Caspasen nach Aspartat-Resten spaltet. Granzym B ist damit in der Lage, sowohl Caspasen selber als auch Caspasen Substrate zu spalten und so unmittelbar in die zentrale Apoptose-Maschinerie einzugreifen. Während Caspase-3 als erstes Substrat für Granzym B identifiziert wurde [Darmon, 1995; Darmon, 1996; Quan, 1996; Atkinson, 1998], konnte in der Folgezeit gezeigt werden, daß Granzym B *in vitro* außerdem Caspase-6, 7, 8, 9 und 10 spaltet [Chinnaiyan, 1996; Duan, 1996; Fernandes-Alnemri, 1996; Gu, 1996; Muzio, 1996; Talanian, 1997; Van de Craen, 1997], wobei Caspase-7 und 10 am schnellsten hydrolysiert werden [Talanian, 1997]). *In vivo* werden Caspase-3, 7 und 8 von Granzym B prozessiert [Atkinson, 1998; Yang, 1998; Medema, 1997]; gespaltene Caspase-3 ist dabei am frühesten nachweisbar [Sutton, 2000]. Während die Aktivierung von Caspase-3 durch Granzym B direkt erfolgt, wurde für die Aktivierung von Caspase-7 ein Zwei-Schritt-Mechanismus beschrieben, bei dem zuerst die Prodomäne von Caspase-7 durch aktive Caspase-3 abgespalten werden muß, damit Caspase-7 für die Spaltung durch Granzym B zugänglich wird [Yang, 1998]. Mit der Fähigkeit zur direkten Aktivierung der Effektor-Caspase-3 ist Granzym B in der Lage, die Apoptose-Signalkaskade an ihrem letzten zentralen Punkt zu initiieren, der jenseits der meisten regulatorischen Mechanismen wie z. B. der Bcl-2 Proteine liegt.

#### **1.3.4 Mechanismus Granzym B-induzierter Apoptose: Bedeutung von Caspasen, Proteinen der Bcl-2 Familie und weiterer Granzym B-Substrate**

Verschiedene Arbeiten beschreiben auch Caspasen-unabhängige Formen von Granzym B-induzierter Apoptose, die in Gegenwart von Caspase-Inhibitoren stattfinden [Sarin, 1997; Talanian, 1997]. Dies ist physiologisch sinnvoll, damit der Organismus mithilfe zytotoxischer Lymphozyten auch Virus-infizierte Zellen eliminieren kann, die virale Apoptose-Inhibitoren (meist Caspase-Inhibitoren) exprimieren. Kondensation des Zellkerns und - zeitlich verzögerte - DNA-Fragmentierung nach Behandlung von Zellen mit Granzym B/Perforin wurde sowohl in Gegenwart des allgemeinen Caspase-Inhibitors zVADfmk [Pinkoski, 2000; Thomas, 2000], eines chemischen Inhibitors von Caspase-3 und 7 sowie des viralen Caspase-Inhibitors „cytokine response modifier A“ (CrmA) [Sharif-Askari, 2001] beobachtet. Caspase-Inhibitoren verhindern darüber hinaus weder die Freisetzung von Cytochrom c noch die Externalisierung von Phosphatidylserin und Zelltod nach Behandlung von Zellen mit Granzym B [Heibein, 1999].

Die Beobachtung, daß Granzym B auch unabhängig von Caspase-Aktivität Apoptose in Zellen induzieren kann, korreliert mit der Fähigkeit der Protease, neben Caspasen auch verschiedene wichtige Caspasen-Substrate zu spalten. Die Proteolyse durch Granzym B erfolgt dabei z. T. auch an anderer Stelle als durch Caspasen.

Besondere Bedeutung als Substrat für Granzym B besitzt das „BH3-only“ Protein Bid [Barry, 2000; Alimonti, 2001]; vgl. 1.2.3), das normalerweise durch Caspase-8 proteolytisch aktiviert wird und durch Interaktion mit Bax oder Bak die Freisetzung von Cytochrom c sowie weiterer proapoptotischer Moleküle aus dem Intermembranraum der Mitochondrien verursacht, die dann zur Ausbildung des Apoptosoms und Aktivierung von Effektor-Caspasen führen (vgl. 1.2.3). Die Proteolyse von endogenem Bid in Zellen nach Behandlung mit Granzym B/Perforin ist ein sehr schnelles Ereignis und erfolgt vor der Spaltung von Caspase-3 [Sutton, 2000] und ICAD (vgl. unten) [Pinkoski, 2001]. Es wurde daher angenommen, daß Granzym B bevorzugt über diesen mitochondrialen Weg Apoptose induziert.



**Abbildung 1.4 Granzym B initiiert verschiedene Signalwege, die zur Induktion von Apoptose führen.** Granzym B induziert Apoptose durch direkte Aktivierung der Effektor-Caspase-3 oder indirekt durch Spaltung von Caspase-8, kann aber auch u. a. die Caspasen-Substrate Bid und ICAD spalten und so den mitochondrialen Signalweg (Bid) aktivieren, der zur Freisetzung von Cytochrom c und weiterer Effektormoleküle aus den Mitochondrien führt, oder durch DNA-Fragmentierung infolge der Aktivierung von CAD apoptotischen Zelltod auslösen. In Abwesenheit von Caspase-Aktivität wurde der Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials  $\Delta\Psi_m$  und Zelltod durch Nekrose beschrieben.

Die Notwendigkeit von Bid, Bak und/oder Bax für die Induktion von Apoptose durch Granzym B wird jedoch widersprüchlich beschrieben [Thomas, 2001; Wang, 2001a]. Gleiches gilt für die Hemmbarkeit Granzym B-induzierter Apoptose durch Bcl-2, das wie unter 1.2.3 dargestellt Apoptose-Signale, die unter Beteiligung der Mitochondrien verlaufen, hemmt [Alimonti, 2001; Pinkoski, 2001; Davis, 2000]. Offenbar kann Granzym B, wenn auch weniger effizient, auch über Signalwege Apoptose induzieren, die ohne Beteiligung von Cytochrom c sowie Apaf-1/Caspase-9 verlaufen und durch Bcl-2 nicht gehemmt werden. Interessanterweise verhindert in einer Arbeit Bcl-2 die Aktivierung von Caspase-3 durch Granzym B, indem die Abspaltung der Prodomäne von Caspase-3 blockiert wird. Als Ursache hierfür wird die mögliche Anwesenheit des Caspase-3 Inhibitors XIAP diskutiert, für dessen Inaktivierung die Freisetzung von Smac/DIABLO aus den Mitochondrien notwendig ist, die wiederum durch Bcl-2 verhindert wird [Sutton, 2000].

Die relative Bedeutung der direkten Aktivierung von Caspasen durch Granzym B gegenüber der Aktivierung von Bid, Freisetzung von Cytochrom c und Induktion von Apoptose über den mitochondrialen Weg *in vivo* ist noch unklar und evtl. verschieden für unterschiedliche Zelllinien. Die verfügbaren Daten legen jedoch nahe, daß Granzym B Apoptose auf mehreren Wegen induzieren kann, so daß Zelltod auch bei Blockierung eines Signalwegs eintritt [Barry, 2002].

Die Fähigkeit von Granzym B, neben Caspasen und Bid weitere Caspasen-Substrate zu

spalten, unterstützt dieses Modell. Wie Caspase-3 spaltet Granzym B auch den Inhibitor ICAD der Caspase-abhängigen DNase CAD [Thomas, 2000; Sharif-Askari, 2001], die für die DNA-Fragmentierung im Verlauf von Apoptose verantwortlich ist. Verschiedene Proteine im Zellkern wurden ebenfalls als Substrate für Granzym B beschrieben. Dazu gehören u. a. poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), die an DNA-Reparaturprozessen beteiligt ist [Froelich, 1996a], das „nuclear mitotic apparatus protein“ (NuMA) und die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK<sub>CS</sub>), die alle auch von Caspasen gespalten werden [Andrade, 1998], sowie ein bisher unbekanntes nukleäres 80 kDa Protein, das mit Heterochromatin assoziiert ist [Pinkoski, 1996]. Neue Daten zeigen darüber hinaus die Spaltung von Lamin B v. a. durch Granzym A, aber auch - weniger effizient - durch Granzym B [Zhang, 2001]. Außerdem wurde die Spaltung des Aktin-bindenden Strukturproteins Filamin durch Granzym B beobachtet [Browne, 2000].

Das einzige bekannte humane Protein, das die enzymatische Aktivität von Granzym B hemmt, ist der zur Familie der Serpine gehörende Proteinase Inhibitor-9 (PI-9) (Übersicht: [Trapani, 2001]). PI-9 wird normalerweise in lymphoiden Geweben, immunprivilegierten Geweben und T-Lymphozyten sowie in reifen dendritischen Zellen [Sun, 1996; Bladergroen, 2001] und Endothelzellen [Buzza, 2001] exprimiert. In hoher Konzentration ist PI-9 v. a. im Zytoplasma von zytotoxischen T-Lymphozyten und NK-Zellen vorhanden und dient dort als Eigenschutzmechanismus gegen sekretiertes oder intrazellulär fehlgeleitetes Granzym B. Neuere Daten zeigen darüber hinaus, daß das L4-100K Protein von Adenovirus Granzym B-Aktivität inhibiert [Andrade, 2001].

#### 1.4 Apoptose in Tumorzellen – Therapiekonzepte

Tumore entstehen, wenn Zellen durch Mutationen in vielen Schritten Eigenschaften erwerben, die es ihnen erlauben, unkontrolliert, d. h. in Abwesenheit von Wachstumssignalen oder unter Umgehung wachstums-hemmender Signale ihrer Umgebung zu proliferieren [Johnstone, 2002; Evan, 2001; Hanahan, 2000]. Mutationen des G-Proteins Ras, das den MAP-Kinase Signalweg aktiviert, sowie verschiedene Veränderungen des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) Signalwegs führen z. B. zu deren konstitutiver Aktivierung unabhängig von Überlebensfaktoren. Die autokrine Stimulierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder deren Überexpression sowie die bevorzugte Expression von solchen Rezeptoren der extrazellulären Matrix (Integrine), die Überlebenssignale vermitteln, erlauben Tumorzellen ebenfalls autonomes Wachstum. Viele anti-proliferative Signale werden durch das Retinoblastoma Protein pRb vermittelt, das in Tumorzellen häufig mutiert und damit inaktiviert ist. Funktionales pRb verhindert normalerweise durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F die Transkription von Genen, die für das Fortschreiten des Zellzyklus von G1 in die S-Phase erforderlich sind; mutiertes pRb erlaubt dagegen unkontrollierte Zellteilung. Darüber hinaus können Tumorzellen unbegrenzt replizieren. Während die kontinuierliche Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden in normalen Zellen deren Lebensdauer bzw. die Anzahl möglicher Replikationszyklen begrenzt, führt die Stabilisierung der Telomere durch Expression von Telomerase oder über andere Mechanismen zur Überwindung der Zellalterung und unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Zelle. Die Versorgung der schnell proliferierenden Zellen eines Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen wird durch die gezielte Neubildung von Blutgefäßen sichergestellt, die durch die Sekretion angiogener Faktoren wie VEGF oder FGF angeregt wird. Schließlich sind metastasierende Tumorzellen in der Lage, unter Verlust des Kontakts zur extrazellulären Matrix ihres Ursprungsgewebes zu überleben, indem sie die

Induktion von Apoptose durch Anoikis vermeiden. Die Fähigkeit, Apoptose-Signalen zu entgehen, ist ein allgemeines charakteristisches Merkmal von Tumorzellen (Übersicht: [Hanahan, 2000]): Die deregulierte Proliferation von Zellen alleine ist für die Entstehung von Tumoren nicht ausreichend. Die Überexpression der wachstumsfördernden Oncogene c-Myc, E1A oder E2F1 z. B. sensitiviert Zellen sogar gegenüber Apoptose [Evan, 1992]. Dagegen verhindert die gleichzeitige Überexpression anti-apoptotischer Proteine oder die Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine die Induktion von Apoptose und erlaubt so das entartete Wachstum dieser Zellen [Bissonnette, 1992; Sabbatini, 1995]. Damit ein Tumor entstehen und metastasieren kann, müssen daher die regulären zellulären Antworten auf hyperproliferative Signale, die normalerweise die Induktion von Apoptose zur Folge haben und Zellen am unbegrenzten Wachstum hindern (wie Sauerstoffmangel, Mangel an Nährstoffen oder veränderte Zelladhäsion), umgangen werden.

Die Blockierung von Apoptose-Signalwegen führt aber auch dazu, daß Tumorzellen der Immunüberwachung durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen entgehen, die entartete Zellen erkennen und v. a. durch Aktivierung des Fas Todesrezeptor-Signalwegs [French, 2002] eliminieren.

Tumore entstehen damit als Gewebeneubildung im Sinne der deregulierten, enthemmten, autonomen Überschußproduktion (Roche Lexikon Medizin) nicht alleine durch die Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose zugunsten einer zu hohen Proliferationsrate, sondern durch den gleichzeitigen Verlust der Fähigkeit der Zellen, apoptotischen Zelltod zu sterben [Evan, 2001].

Für die therapeutische Behandlung von Tumoren stehen damit prinzipiell zwei Ansätze zur Verfügung: einerseits die Induktion von Apoptose trotz bestehender inhibitorischer Mechanismen des Tumors, die zur Vernichtung der entarteten, unkontrolliert proliferierenden Zellen führt; andererseits die Wiederherstellung der defekten Regulationsmechanismen, die die Eliminierung der Zellen durch die eigenen wiedergewonnenen Kontrollmechanismen zur Folge hat.

#### 1.4.1 Die „klassische“ Chemotherapie und Problem der Therapie-Resistenz

Neben der chirurgischen Entfernung von Tumorgewebe werden zur Behandlung von Tumoren v. a. Radio- und Chemotherapie eingesetzt. Beide Strategien zielen jedoch nicht darauf ab, die defekten Regulationsmechanismen der Tumorzellen zu korrigieren, sondern der gegenüber normalem Gewebe erhöhten Proliferationsrate durch Blockierung der Mitose entgegenzuwirken. Sowohl durch radioaktive Strahlung als auch durch Chemotherapeutika werden sich teilende Zellen vor allem auf Ebene der DNA-Replikation geschädigt: Als Zytostatika werden DNA-alkylierende Reagenzien, Topoisomerase-Hemmer, Nukleotid-Analoga, Antimetabolite, die die Synthese der DNA-Basen blockieren, sowie pflanzliche Alkaloide verwendet, die an Tubulin binden und den Aufbau der Tubulin-Fasern für die Verteilung der verdoppelten Chromosomen auf die zwei Tochterzellen verhindern [Igney, 2002; Hellman, 1996]. Diese Substanzen beeinflussen aber auch normale, sich schnell teilende Zellen v. a. im Knochenmark und Darm, so daß z. T. erhebliche Nebenwirkungen auftreten.

Die meisten Chemotherapeutika führen letztlich zur Induktion von Apoptose [Lowe, 2000]. Allerdings werden apoptotische Signalwege nicht direkt aktiviert, sondern als sekundäre Antwort auf die Schädigung der DNA oder Blockierung der Zellteilung [Igney, 2002; Johnstone, 2002]. Normale Zellen erkennen diese Schäden, was zur Induktion von Apoptose über den intrinsischen Signalweg führt, der unter Beteiligung von p53 aktiviert wird. p53 initiiert Apoptose unter anderem durch transkriptionelle Aktivierung pro-apoptotischer Bcl-2 Proteine (Bax, Bak, Noxa, Puma) bei gleichzeitiger Reprimierung von anti-apoptotischem Bcl-2 und



Bcl-x<sub>L</sub> sowie von IAPs [Ryan, 2001]. Tumorzellen entziehen sich jedoch häufig diesem Kontrollmechanismus, indem sie kein oder kein funktionales p53 exprimieren, so daß die Initiation von Apoptose infolge schwerwiegender DNA-Schäden ausgeschaltet wird. Tatsächlich ist p53 das in humanen Tumoren am häufigsten mutierte Tumor-Suppressor Gen [Johnstone, 2002; Hanahan, 2000]. Es werden aber auch Mutationen oder die veränderte Expression von p53 Regulatoren (z. B. Mdm-2, ATM, p19<sup>ARF</sup>) wie auch von p53 nachgeordneten Effektoren (z. B. Bax, Bak, PTEN, Apaf-1) in Tumorzellen beobachtet. Einige Chemotherapeutika wirken jedoch nicht über p53, sondern aktivieren den mitochondrialen Apoptoseweg direkt. Andererseits treten auch andere Veränderungen in Apoptose-Signalwegen auf, die dazu führen, daß Tumorzellen resistent gegenüber der Induktion von Apoptose werden, wie z. B. die Überexpression des Caspase-8 Inhibitors c-Flip oder des löslichen „decoy“ Rezeptors DcR3, die verringerte Expression von CD95 oder auch der Verlust der Expression von Caspasen [Kischkel, 2001] (Übersicht: [Igney, 2002; Johnstone, 2002]).

Diese (genetischen) Veränderungen, die einerseits zur Entstehung von Tumoren beitragen, führen andererseits dazu, daß Tumorzellen nicht nur resistent sind gegenüber physiologischen Apoptose-Signalen (wie Fehlen von Wachstumsfaktoren, Sauerstoffmangel, Verlust des Zell-Matrix-Kontakts), sondern auch gegenüber nicht-physiologischen Apoptose-Stimuli (Chemotherapeutika). Ein Hauptproblem bei der Behandlung von Tumorerkrankungen ist daher das Nichtansprechen auf Chemo- oder Strahlentherapie, wobei die Resistenz häufig nicht erst durch eine vorausgegangene Behandlung induziert wurde, sondern bereits im Primärtumor vorhanden ist. Durch die Behandlung mit klassischer Chemo- oder Radiotherapie wird aber auch ein Selektionsdruck auf die meist heterogenen Zellpopulationen eines Tumors ausgeübt, wobei weniger entartete Zellen auf die Therapie ansprechen und eliminiert werden, während stärker entartete Zellen, die z. B. p53 Funktion bereits verloren haben, überleben (quasi selektioniert werden), dann jedoch resistent gegenüber weiterer Behandlung sind [Johnstone, 2002].

Durch Behandlung mit DNA-schädigenden Chemotherapeutika können (Tumor-)Zellen aber auch zusätzliche Mutationen erwerben, die die Bildung neuer Tumore bewirken oder dazu führen, daß der ursprüngliche Tumor weiter entartet und zunehmend therapieresistent wird. Vielfach treten z. B. Leukämien nach klassischer Tumorbehandlung mit Chemotherapie auf [Leone, 1999]. Daher sind neue therapeutische Strategien zur Behandlung von Tumoren erforderlich, die effizient, direkt und selektiv wirken, um Resistenzen sowie die Selektion stärker entarteter Zellen zu vermeiden und Nebenwirkungen zu minimieren.

#### 1.4.2 Neue Therapiekonzepte

Obwohl Tumore vielfach resistent gegenüber Chemotherapeutika sind, haben die meisten Tumorzellen nicht grundsätzlich die Fähigkeit verloren, apoptotischen Zelltod zu sterben, d. h. je nach Stimulus kann in praktisch jeder Tumorzelle trotzdem Apoptose induziert werden. Für eine erfolgreiche Tumorthherapie sind daher neue Ansätze erforderlich, die auf der Kenntnis der veränderten Signalwege basieren, die in Tumorzellen aktiv sind.

Neue Therapieformen werden einerseits entwickelt, durch die gezielt einzelne Defekte in Tumorzellen korrigiert werden. Dazu gehören z. B. gentherapeutische Ansätze zur Wiedereinführung von p53 in Tumorzellen, die normale p53 Funktion verloren haben; Antisense Strategien, die die Überexpression von anti-apoptotischen Molekülen wie Bcl-2 reduzieren; Histon Deacetylase Inhibitoren, wenn apoptotische Signalwege durch „gene silencing“ inaktiviert sind; oder die Inhibierung von Überlebenssignalwegen, z. B. die Blockierung des Abbaus von IκB durch Proteasom-Inhibitoren. Solche Ansätze erfordern jedoch sehr genaue Kenntnis der Defekte, die in dem konkret zu behandelnden Tumor vorliegen. Angesichts der sehr großen Vielfalt von mehr als 100 verschiedenen Krebsarten und dem Auftreten weiterer

Tumorsubtypen in einzelnen Organen sind solche Ansätze wahrscheinlich jedoch nur als individualisierte Therapien einsetzbar (Übersicht: [Johnstone, 2002; Nicholson, 2000]).

Andere neue Ansätze zur Therapie von Tumor-Erkrankungen zielen darauf, Apoptose-Signalwege nicht indirekt, wie im Fall der klassischen Chemotherapie, sondern direkt zu aktivieren. Eine Möglichkeit dazu bietet die Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Familie, da dieser Signalweg in Tumorzellen nur selten blockiert ist. Bereits 1868 wurde bei einigen Tumor-Patienten die spontane Regression des Tumors infolge einer akuten bakteriellen Infektion beobachtet. Als dafür verantwortliche Faktoren wurden schließlich die zur TNF-Familie gehörenden Proteine Tumor Nekrose Faktor (TNF) und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) identifiziert (Übersicht: [Ashkenazi, 2002]), die von Immunzellen als Reaktion auf die bakterielle Infektion sekretiert werden und die ebenfalls anti-Tumor Aktivität besitzen, indem sie durch Aktivierung des TNF-Rezeptors Apoptose auslösen. TNF kann jedoch nicht systemisch in klinisch relevanten Dosen verabreicht werden, da erhebliche Nebenwirkungen auftreten, die durch die gleichzeitige Induktion inflammatorischer Reaktionen (Fieber, Lungen- und Leberversagen, Absinken des Blutdrucks, Blutgerinnung) hervorgerufen werden [Hersh, 1991].

Ein weiterer Ligand der TNF-Familie, Trail [Wiley, 1995], wird derzeit als vielversprechendes Molekül für den Einsatz in der Tumorthherapie untersucht, da Trail im Gegensatz zu TNF intrinsische Tumorzell-Spezifität besitzt. Trail induziert Apoptose in einer Vielzahl humaner Tumorzellen, während die meisten normalen Zelltypen relativ resistent gegenüber Trail sind [Ashkenazi, 2002]. Die Induktion von Apoptose erfolgt unabhängig vom p53 Status der Zellen. Allerdings wurde die Resistenz von Tumorzelllinien gegenüber Trail-induzierter Apoptose infolge des Verlustes der Expression von Caspase-8 [Grotzer, 2000] sowie der Überexpression von Bcl-2 [Fulda, 2002] beschrieben. Die molekularen Grundlagen der Tumorzell-Selektivität sind bisher noch unbekannt; im physiologischen Kontext spielt Trail jedoch eine wichtige Rolle bei der Tumorabwehr durch das Immunsystem [Cretney, 2002]. In verschiedenen Tumormodellen in Mäusen konnten mit rekombinanten Formen von Trail bedeutende therapeutische Erfolge erzielt werden, ohne daß systemische Toxizität beobachtet wurde [Ashkenazi, 2002]. Für die klinische Anwendung von Trail sind jedoch weitere Toxizitäts-Untersuchungen erforderlich.

### ***Tumorzellspezifische Therapie: Die ErbB Rezeptor-Familie als Zielstrukturen für gerichtete Tumorthherapie; Antikörper und Immuntoxine***

Tumorzell-spezifische therapeutische Ansätze, die entwickelt werden, um die Schädigung von gesundem Gewebe bei systemischer Applikation zu vermeiden, basieren auf der Beobachtung, daß Tumorzellen ein anderes Expressionsmuster an Zelloberflächenmolekülen aufweisen als normale Zellen. Ein Beispiel für solche Tumor-assoziierten Antigene sind Mitglieder der ErbB/EGF-Rezeptor Familie [Olayioye, 2000], die zu den Rezeptor Tyrosin-Kinasen gehören. Die Aktivierung dieser Rezeptoren durch Liganden-induzierte Dimerisierung führt zur Autophosphorylierung der Rezeptoren und unter anderem zur nachfolgenden Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs. Während diese Wachstumsfaktor-Rezeptoren auf normalen adulten Zellen nur in sehr geringem Maße exprimiert werden, sind sie auf verschiedenen Tumoren stark überexprimiert und gewähren dem Tumor dadurch einen Wachstumsvorteil, was zur malignen Transformation beiträgt. Insbesondere EGF-Rezeptor und ErbB2 sind auf einer Vielzahl humaner Adenokarzinome überexprimiert und stellen daher geeignete Antigene für eine zielgerichtete Tumorthherapie dar [Yu, 2000; Wels, 1996].

Antagonistisch wirkende Antikörper gegen die extrazelluläre Ligandenbindungsstelle der ErbB-Rezeptoren werden bereits klinisch als Antitumor-Therapeutika getestet. Herceptin®, ein monoklonaler ErbB2-spezifischer Antikörper, ist in der EU seit 2000 als Medikament

zugelassen. Herceptin® wie auch ein EGF-Rezeptor-spezifischer Antikörper C225 werden in Kombination mit klassischer Chemotherapie (Taxol) eingesetzt, wobei eine Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber der Chemotherapie durch die gleichzeitige Behandlung mit Antikörpern beobachtet wurde [Pegram, 1998]. Allerdings sprechen nur ca. 50% der behandelten Patienten auf Herceptin® an.

Als therapeutische Moleküle, die sowohl selektiv Tumorzellen angreifen, als auch eine direkte zytotoxische Wirkung besitzen, wurden rekombinante Toxine entwickelt, die aus einem Tumorzell-spezifischen Ligand und einem Toxin-Polypeptid bestehen. Als Tumorzell-spezifische Proteindomäne, die an Tumorantigene bindet, können Antikörper, Antikörperfragmente wie „single chain“ Antikörper oder auch Zytokine oder andere Peptidliganden verwendet werden. Antikörper-Fusionsproteine werden auch als Immuntoxine bezeichnet. Extrem wirkungsvolle, katalytisch wirkende Toxine, die als zytotoxische Domäne in solchen Fusionsproteinen eingesetzt werden, sind die bakteriellen Proteine Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* und Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* sowie das Pflanzenprotein Ricin aus *Ricinus alba* [Frankel, 2000]. Häufig ist ein einziges Toxin-Molekül pro Zelle ausreichend, um apoptotischen Zelltod auszulösen, der durch Blockierung der Protein Biosynthese hervorgerufen wird [Keppler-Hafkemeyer, 2000]. Um unspezifische Bindung an nicht-transformierte Zellen zu vermeiden, werden Fragmente dieser Toxine verwendet, die die Zellbindungsdomäne der Toxine nicht mehr enthalten.

Verschiedene Immuntoxine, die unterschiedliche Tumorantigene erkennen, wurden in den letzten Jahren in klinischen Studien untersucht und zeigen z. T. deutliche antitumorale Wirkung (Übersicht: [Frankel, 2000; Kreitman, 1999]). Ein generelles Problem solcher Moleküle für den Einsatz als Tumortheraeutika besteht jedoch darin, daß die Toxindomäne bakteriellen Ursprungs und damit immunogen im menschlichen Organismus ist. Trotz Therapie-Erfolgen sind Immuntoxine daher nur zeitlich begrenzt einsetzbar, da neutralisierende Antikörper gebildet werden [Hall, 2001; Kreitman, 2000]. Als Nebenwirkung wurde darüber hinaus v. a. bei Toxinen, die von Exotoxin A abgeleitet wurden, Lebertoxizität beobachtet [Onda, 2000; Pai-Scherf, 1999].

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Die Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere im metastasierenden Stadium, stellt eine besondere Herausforderung hinsichtlich einer effizienten Therapie dar, da einerseits in Tumorzellen vielfach Mechanismen aktiv sind, die dazu führen, daß die Induktion von apoptotischem Zelltod blockiert wird, andererseits die systemische Behandlung des Patienten erforderlich ist, um Metastasen zu eliminieren, wobei jedoch die Schädigung von gesundem Gewebe vermieden werden muß. Sowohl das Auftreten von Resistenzen als auch die z. T. erheblichen Nebenwirkungen beschränken daher den Erfolg klassischer Chemotherapie. Neue therapeutische Ansätze zielen daher darauf, 1) Apoptose über einen direkten Mechanismus zu induzieren, der unabhängig von den in Tumorzellen deregulierten Apoptose-Signalwegen wie Inaktivierung von p53 oder Überexpression von Bcl-2 wirkt; und 2) selektiv Tumorzellen anzugreifen, um Nebenwirkungen zu vermeiden. Mithilfe von Antikörperfragmenten, die spezifisch an Tumor-assoziierte Antigene binden, konnten bakterielle Toxine mit beachtlicher Tumorzell-Selektivität ausgestattet werden, die sowohl *in vitro* wie auch in murinen Tumormodellen die selektive Eliminierung von solchen Tumorzellen erlaubt, die das Zielantigen exprimieren [Schmidt, 1999; Maurer-Gebhard, 1998] (Übersicht: [Frankel, 2000; Kreitman, 1999]). Der klinische Einsatz dieser Moleküle wird jedoch durch die Immunogenität der bakteriellen Toxin-

domänen erheblich einschränkt. Dagegen könnten neuartige Antikörper-Fusionsproteine, die humane pro-apoptotische Effektorfunktionen enthalten, vielversprechende Moleküle für eine effiziente Tumorthherapie darstellen.

Die Kopplung von Mitgliedern der TNF-Familie mit Antikörperfragmenten zum spezifischen Retargeting dieser Liganden wurde beschrieben [Wajant, 2001; Hoffmann, 1998]. Allerdings stellt die Aktivierung von Todesrezeptoren einen Apoptose Stimulus dar, der auf der Ebene von physiologischen Apoptose-Signalen erfolgt und daher bei Blockierung der nachgeordneten Signalkaskade nicht zum beabsichtigten Effekt führt. Andere humane pro-apoptotische Proteine, die für neue anti-Tumor Strategien untersucht werden, sind Mitglieder der Bcl-2 Familie. Rekombinante Fusionsproteine, die Bik, Bak oder Bax neben dem Peptidhormon „Gonadotropin-releasing hormone“ (GnRH) als Tumor-targeting Domäne enthalten, induzieren Apoptose in verschiedenen Adenokarzinom Zelllinien *in vitro* [Azar, 2000].

Als Apoptose-induzierende Aktivität für Tumorzell-spezifische Fusionsproteine sind Enzyme von besonderem Interesse, da wahrscheinlich relativ geringe intrazelluläre Konzentrationen ausreichen, um Apoptose zu induzieren. Die Verwendung der Caspase-aktivierten DNase CAD als Fusion mit GnRH zur spezifischen Induktion von Apoptose in Adenokarzinom Zelllinien sowie in murinen Tumormodellen wurde berichtet [Ben-Yehudah, 2003]; die Experimente wurden aber nur mit partiell gereinigtem rekombinanten Protein ausgeführt, und es waren relativ hohe Proteinkonzentrationen erforderlich, um Apoptose *in vitro* zu induzieren.

Caspasen sind die Moleküle, die am unteren Ende der Apoptose Signalkaskaden aktiviert werden und als Effektoren von apoptotischem Zelltod fungieren, wobei insbesondere die Effektor-Caspase-3 eine zentrale Rolle spielt (vgl. 1.2.1). Das gezielte Einschleusen von aktiver Caspase-3 in Tumorzellen wäre damit ein besonders vielversprechender Ansatz zur Induktion von Apoptose unabhängig von den verschiedenen Mechanismen, die Apoptose in Tumorzellen blockieren. Daneben erscheint die Serin-Protease Granzym B aus zytotoxischen T-Lymphozyten ebenfalls gut geeignet für die Verwendung als Effektorfunktion in „humanisierten“, Immuntoxin-ähnlichen Fusionsproteinen zur spezifischen Induktion von Apoptose in Tumorzellen. Granzym B ist neben Caspasen als einziges Enzym in der Lage, Caspase-3 zu aktivieren, kann jedoch wahrscheinlich auch unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren, indem es direkt Caspasen-Substrate wie ICAD oder Bid spaltet (vgl. 1.3.4). Granzym B kann damit offenbar an verschiedenen Punkten in Apoptose Signalwege eingreifen, die alle unmittelbar die Initiierung von Apoptose bewirken.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, rekombinante Formen von Granzym B und Caspase-3 herzustellen und deren mögliche Verwendbarkeit zur direkten Induktion von Apoptose in Tumorzellen zu untersuchen. Während die Expression von aktiver Caspase-3 in *E. coli* in der Literatur bereits beschrieben wurde [Mittl, 1997; Rotonda, 1996], war zu Beginn der Arbeit nur relativ wenig über Granzym B bekannt. Rekombinantes, enzymatisch aktives Granzym B konnte nach transienter Transfektion in COS Zellen nachgewiesen werden [Caputo, 1993], die Produktion und Reinigung größerer Mengen rekombinanten Proteins wurde jedoch nicht berichtet. Neben der Etablierung eines geeigneten Expressionssystems zur Herstellung von Granzym B als rekombinantes, nicht-modifiziertes Enzym war es daher erforderlich, das Verhalten von rekombinantem Granzym B gegenüber Gewebekulturzellen hinsichtlich seiner zytotoxischen Aktivität zu charakterisieren, um Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die Protease oder modifizierte Formen als zytotoxische Effektorfunktion in Antikörper-Fusionsproteinen zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen eingesetzt werden könnten. Sowohl für Granzym B als auch für Caspase-3 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem untersucht, ob beide Proteine unter Erhalt der enzymatischen Aktivität mit Antikörper-Fragmenten fusioniert werden können, die eine gezielte Aufnahme der Proteasen in Tumorzellen und Induktion von Apoptose erlauben. Hierzu wurde als Tumorzell-

spezifische Zellbindungsdomäne ein ErbB2-spezifischer single-chain Antikörper FRP5 eingesetzt, der bereits in Immuntoxinen, immunmodulatorischen Fusionsproteinen sowie in Tumorzell-spezifischen gentherapeutischen Ansätzen für therapeutische Zwecke verwendet wurde [Wang, 2001b; Azemar, 2000; Maurer-Gebhard, 1998; Wels, 1992; Gerstmayer, 1997b; Rohrbach, 2000; Uherek, 1998b].

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien, Chromatographie-Medien, Verbrauchsmaterial, Reagenzien**

Chemikalien:

Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg) oder Roche Diagnostics (Mannheim)

Zutaten zur Herstellung bakterieller Wachstumsmedien oder Hefewachstumsmedien:

Difco (Augsburg)

Proteinmassen-Marker (bench mark),

DNA-Längenstandard:

Gibco BRL (Eggenstein)

Chelatisierende Sepharose:

Amersham (Freiburg)

Glutathion Agarose:

Sigma (Deisenhofen)

Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur:

Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhäuser), Schleicher & Schuell (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA)

Dialyseschläuche:

Roth (Darmstadt)

Immobilon-P Transfer Membran:

Millipore (Eschborn)

Whatman 3MM Filterpapier:

Whatman (London, GB)

Zellkulturmedien, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösung und

Antibiotika für die Zellkultur:

Serva (Heidelberg)

Fötale Kälberserum für die Zellkultur:

Biowhittaker (Verviers, Belgien)

Sulfo-NHS-Biotin:

Pierce (Rockford, IL, USA)

BioPORTER™:

Gene Therapy Systems (San Diego, CA, USA)

ECL Chemolumineszenz kit:

Amersham (Freiburg)

humanes Granzym B gereinigt:

Alexis (Grünberg)

aktive Caspase-3, rekombinant:

Pharmingen (Heidelberg)

Granzym B und Caspase-3 Peptid-Substrate und -Inhibitoren:

Alexis (Grünberg)

Streptavidin

NEB (Schwalbach)

#### **2.1.2 Enzyme**

Enzyme für die Molekularbiologie wurden jeweils mit geeignetem Puffer, soweit nicht anders angegeben, von New England Biolabs (Schwalbach) oder Roche Diagnostics (Mannheim), RNase von Roth (Darmstadt) bezogen.

### 2.1.3 Antikörper und Nachweisreagenzien

#### Name (Antigen)

##### Erstantikörper

anti-Myc 9E10 (Myc-Epitop) aus Maus  
SWA11 (SWA11-Epitop) aus Maus  
anti-Granzym B 2C5 aus Maus  
anti-Granzym B Antiserum aus Maus  
anti-Caspase-3 E-8 aus Maus  
anti-Glutathion-S-Transferase aus Ziege  
anti-Streptavidin Antiserum aus Kaninchen

#### Hersteller bzw. Referenz

[Evan, 1985]  
[Smith, 1989]  
Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)  
diese Arbeit  
Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)  
Pharmingen (Heidelberg)  
Sigma (Deisenhofen)

##### Zweitantikörper

Ziege anti-Maus IgG, AP-gekoppelt  
Ziege anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt  
Esel anti-Maus IgG, Alexa488-gekoppelt  
Ziege anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt  
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt  
Ziege anti-Kaninchen IgG, FITC-gekoppelt  
Schaf anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt  
Streptavidin, AP-gekoppelt

Sigma (Deisenhofen)  
Sigma (Deisenhofen)  
Molecular Probes (Leiden, NL)  
Sigma (Deisenhofen)  
Sigma (Deisenhofen)  
Dianova (Hamburg)  
Sigma (Deisenhofen)  
Promega (Mannheim)

### 2.1.4 Plasmide

#### pBluescriptII KS (Stratagene)

Kloniervektor

#### pBIKSmh [Gerstmayer, 1997a]

enthält die für Myc-Epitop und His-tag kodierenden Sequenzen zwischen der XbaI und NotI site.

#### pSW50mh [Gerstmayer, 1997a]

pFLAG (Kodak International Biotechnologies Inc.) basierender Vektor für die Expression von Proteinen mit C-terminalem Myc-Epitop und Hexahistidin-tag in *E. coli*; enthält die für Myc-Epitop und His-tag kodierenden Sequenzen zwischen der XbaI und BglII site von pSW50 [Wels, 1995].

#### pSW50sh [Gerstmayer, 1997a]

analog zu pSW50mh für die Expression von Proteinen mit C-terminalem SWA11-Epitop und Hexahistidin-tag in *E. coli*.

#### pSW5-2 \*

basiert auf pSW50mh und enthält die Sequenz kodierend für Myc-Epitop und Hexahistidin-tag zusätzlich zwischen den NdeI und XbaI sites.

#### pGEX-4T1 (Pharmacia)

Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*.

#### pGEX-KG [Guan, 1991]

Vektor für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*, basierend auf pGEX-4T2 (Pharmacia) mit Glycin-Serin-linker und erweiterter multiple cloning site.

#### pPIC9 (Invitrogen)

Vektor für die Expression von Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* und Sekretion ins Medium.

**pWW152-5 ORF** [Wels, 1995]

enthält die cDNA des ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörpers FRP5 zwischen den HindIII und XbaI sites eines modifizierten pBluescriptII KS<sup>+</sup>.

**pSW220 ad. (M. Schmidt, unveröffentlicht)**

*E. coli* Expressionsvektor; enthält die cDNA kodierend für den „single chain“ Antikörper FRP5 mit N-terminalem Flag-Epitop und Hexahistidin-tag sowie die Domäne II von Exotoxin A zwischen den HindIII und XhoI sites von pFlag (Kodak International Biotechnologies, USA). Für C-terminale Genfusionen steht vor der XhoI site eine NheI site zur Verfügung.

**pPIC9-GD5** [Uherek, 1998a]

enthält die DNA-Bindedomäne von Gal4 als AvrII, NheI-Fragment sowie die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und den „single chain“ Antikörper FRP5 mit C-terminalem Myc-Epitop und His-tag als NheI, NotI-Fragment.

**pSW5-EG5** [Sloots, 1998]

enthält die DNA-Sequenz der Aminosäuren 280-366 der Domäne II von Exotoxin A als NdeI, KpnI-PCR-Produkt sowie die über KpnI und HindIII klonierte Gal4 DNA-Bindedomäne und den „single chain“ Antikörper FRP5 als HindIII, XbaI-Fragment.

**pBIKS[GrB] \***

enthält die vollständige cDNA von humanem Granzym B.

**pSW5[GrB] \***

enthält die cDNA von reifem Granzym B (AS 21-247), die über PCR mit den entsprechenden primern synthetisiert und zwischen die NdeI und XbaI sites von pSW50mh inseriert wurde.

**pGEX-KG[GrBmh] \***

enthält die cDNA von reifem Granzym B, die als NdeI, XhoI-Fragment aus pSW5[GrB] gewonnen und in die BamHI und XhoI sites von pGEX-KG nach „fill-in“ Reaktion an den überhängenden DNA-Enden der NdeI und BamHI sites inseriert wurde.

**pSW5[GrB-DT-5] \***

enthält die als NdeI, XbaI-Fragment aus pGEX-4T1[GrB-DT-5mh] gewonnene Sequenz für reifes Granzym B, N-terminal fusioniert an die cDNA der Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und den „single chain“ Antikörper FRP.

**pPIC9[GrBmh] \***

enthält die cDNA von reifem Granzym B, die als PCR-Produkt mit XhoI und NheI Schnittstellen zunächst in die XhoI und XbaI sites von pBIKSmh inseriert und als XhoI, NotI-Fragment in die entsprechenden sites von pPIC9 subkloniert wurde.

**pPIC9Δ[GrBmh] \***

wie pPIC9[GrBmh], das Tetrapeptid EAEA nach der KEX2-Spaltstelle für die Abspaltung des α-Faktor Signalpeptids wurde deletiert (vgl. 3.1.8).

**pPIC9Δ[GrBS183Amh] \***

Vektor zur Expression einer enzymatisch inaktiven Mutante von Granzym B; enthält die Punktmutation S183A (vgl. 3.1.10).

**pPIC9 Δ[GrB-mh-tatNLS] \***

wie pPIC9Δ[GrBmh], enthält zusätzlich 9 Aminosäuren des Kernlokalisierungssignals des HIV Tat-Proteins am C-Terminus. Diese wurden als Oligonukleotid zunächst hinter die Sequenz des Myc-His-tag zwischen die NheI und BglII sites von pUHD10-31[GrBmh] inseriert und das GrB-mh-tatNLS-



Konstrukt als SacII, XbaI-Fragment in die entsprechenden sites von pcDNA3+ (M. Fritsche, unveröffentlicht) ligiert. Aus dem resultierenden pcDNA3+[GrBmh-tatNLS] wurde das Konstrukt als KpnI, XbaI-Fragment (mit einem Teil des Polylinkers) herausgeschnitten und in pBIIKS ligiert. Über eine interne HindIII site in der Sequenz von Granzym B wurde das C-terminale HindIII, NotI-Fragment aus pBIIKS[GrBmh-tatNLS] gewonnen und in pPIC9Δ[GrBmh] gegen das entsprechende Fragment ohne tatNLS ausgetauscht.

**pPIC9Δ[GrB-5mh] \***

enthält die cDNA von reifem Granzym B, die als PCR-Produkt mit XhoI und ClaI Schnittstellen synthetisiert wurde. Diese wurde in einer Tripelligation zusammen mit der aus pWW152-5(ORF) als ClaI, XbaI-Fragment gewonnenen cDNA kodierend für den „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) zunächst in die XhoI und XbaI sites von pBIIKSmh inseriert. Das XhoI, NotI-Fragment wurde in die entsprechenden sites von pPIC9 subkloniert.

**pPIC9Δ[GrB-DT-5mh] \***

enthält die als PCR-Produkt mit XhoI und NheI Schnittstellen synthetisierte cDNA von reifem Granzym B, die in einer Tripelligation mit dem NheI, NotI-Fragment aus pPIC9-GD5 kodierend für die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und dem „single chain“ Antikörper FRP5 in die XhoI und NotI sites von pPIC9 inseriert wurde.

**pGEX-4T1[XaGrBmh] \***

enthält zusätzlich zu der Vektor-kodierten Thrombin-Schnittstelle für die Abspaltung des GST-Anteils eine Faktor Xa-Spaltstelle, an die direkt die Sequenz für reifes Granzym B fusioniert wurde. Das Xa-GrBmh-Fragment wurde als PCR-Produkt an pPIC9Δ[GrBmh] synthetisiert und in die BamHI und NotI sites von pGEX-4T1 inseriert.

**pGEX-4T1[XaGrBS183Amh] \***

wie pGEX-4T1[XaGrBmh], enthält jedoch die von pPIC9Δ[GrBS138Amh] abgeleitete enzymatisch inaktive Punktmutante Granzym B S183A.

**pGEX-4T1[XaGrB-5mh] \***

wie pGEX-4T1[XaGrBmh], kodiert jedoch das von pPIC9Δ[GrB-5mh] abgeleitete Fusionsprotein aus Granzym B und dem „single chain“ Antikörper FRP5.

**pGEX-4T1[XaGrB-DT-5mh] \***

wie pGEX-4T1[XaGrBmh], kodiert jedoch das von pPIC9Δ[GrB-DT-5mh] abgeleitete Fusionsprotein aus Granzym B, der Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und dem „single chain“ Antikörper FRP5.

**pBIIKS[Caspase-3] \***

enthält die vollständige cDNA von humaner Caspase-3.

**pSW5[Caspase-3sh] \***

enthält die vollständige cDNA von Caspase-3 als NdeI, XbaI-Fragment aus pBIIKS[Caspase-3].

**pSW5[p17sh] \***

enthält die cDNA kodierend für die p17 Untereinheit von Caspase-3, die über PCR mit den entsprechenden primern synthetisiert und in die NdeI und XbaI sites von pSW50sh inseriert wurde.

**pSW5-2[p12] \***

enthält die cDNA kodierend für die p12 Untereinheit von Caspase-3, die über PCR mit den entsprechenden primern synthetisiert und in die XbaI und XhoI sites von pSW5-2 inseriert wurde.

**pSW5[p17-DT-5sh] \***

enthält die cDNA der p17 Untereinheit von Caspase-3 als NdeI, XbaI PCR-Produkt fusioniert an die DNA-Sequenz kodierend für die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und den „single chain“ Antikörper FRP5. Das p17 PCR-Fragment wurde zunächst anstelle von Granzym B zwischen die NdeI und NheI sites von pGEX-4T1[GrB-DT-5mh] ligiert und anschließend das p17-DT-5 Konstrukt als NdeI, XbaI-Fragment in pSW50sh inseriert.

**pSW5[p12-DT-5] \***

enthält die cDNA der p12 Untereinheit von Caspase-3, fusioniert an die DNA-Sequenz kodierend für die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin und den „single chain“ Antikörper FRP5. Das p12 DNA-Fragment wurde zunächst als NdeI, XbaI PCR-Produkt zwischen die NdeI und NheI sites von pGEX-4T1[GrB-DT-5mh] ligiert und anschließend das p12-DT-5 Konstrukt als NdeI, XbaI-Fragment in pSW50mh inseriert.

**pSW220 ad.[p12] \***

enthält die cDNA der p12 Untereinheit von Caspase-3 als XbaI, XhoI PCR-Produkt zwischen den NheI und XhoI sites von pSW220ad.

**pSW220 ad.[p17sh] \***

enthält die cDNA der p17 Untereinheit von Caspase-3, die als NdeI, XhoI-Fragment aus pSW5[p17sh] nach Nuklease-Verdau des überhängenden Endes der NdeI Schnittstelle zwischen den NheI und XhoI sites von pSW220ad. inseriert wurde. Das überhängende Ende der NheI site wurde dazu mit Klenow aufgefüllt.

**pSW5[EtaII<sub>280-366</sub>-p17] \***

enthält die cDNA der p17 Untereinheit von Caspase-3 als KpnI, XbaI PCR-Produkt zwischen den entsprechenden sites in pSW5-EG5.

**pSW5[EtaII<sub>280-366</sub>-p17-5] \***

enthält die cDNA der p17 Untereinheit von Caspase-3 als KpnI, HindIII PCR-Produkt zwischen den entsprechenden sites in pSW5-EG5.

\* diese Arbeit

## 2.1.5 Oligonukleotide

PCR primer für die Klonierung der cDNA von humanem Granzym B:

|             |                           |
|-------------|---------------------------|
| 5' XhoI GrB | aaactcgagatgcaaccaatcctgc |
| 3' SacI GrB | tatgagctcttagtagcgtttcatg |

PCR primer für die Subklonierung der cDNA von reifem Granzym B in pSW5:

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| 5' NdeI GrB | accttaacatgatcatcggggggacatgaggccaag |
| 3' NheI-GrB | ttgctagcccgtagcgtttcatgg             |

PCR primer für die Subklonierung der cDNA von reifem Granzym B in pPIC9:

|                  |   |
|------------------|---|
| 5' XhoI ΔEAEAGrB | attctcgagaaaagaatcatcgggggacatgag             |
| 5' XhoI GrB      | attctcgagaaaagagaggctgaagctatcatcgggggacatgag |

PCR primer für die Einführung der S183A Punktmutation in die cDNA von Granzym B:

|                 |                             |
|-----------------|-----------------------------|
| 5' mut GrB SalI | ttaaggtcgacgctggaggccctcttg |
| 3' mut GrB SalI | tccagagtcgacctaaaggaagtc    |

PCR primer für die Klonierung von pGEX-4T1[Xa-GrB] und dessen Derivate:

5' BamHI GrB für pGEX      gcggatccatcgaagtcgtatcatcgggggacatgagc  
3' NotI GrB für pGEX      tataattcgcggccgctctagctagtgtgtgatgatg

PCR primer für Klonierung von pPIC9[GrB-5]

3' ClaI GrB      tgatcgatcccgtagcgtttcatgg

PCR primer für die Klonierung der cDNA von humaner Caspase-3:

5' BamHI,NdeI Casp3      ttaatagatccatattggaacactg  
3' SacI,XbaI Casp3      aaccagagctctagagagtataaaaatag

PCR primer für die Subklonierung der cDNA der p17 Caspase-3 Untereinheit:

5' p17 BamHI,NdeI Casp3      agcggatcccatattgtctggaatccctggac  
3' p17 SacI,XbaI Casp3      ttatcgagctctagatctgtctcaatgccacag

PCR primer für die Subklonierung der cDNA der p12 Caspase-3 Untereinheit:

5' p12 XbaI,NdeI Casp3      tcaatctagatcatatgagtgggtgtgatgatgacatgg  
3' p12 XhoI,BglII Casp3      acaatctcgagagatcttagtgataaaaatagagtcttttg

PCR primer für die Amplifizierung der in das Genom von *Pichia pastoris* integrierten cDNA Konstrukte:

5' AOX1      gactgggtccaattgacaagc  
3' AOX1      ggatgtcagaatgccatttg

PCR primer für die Amplifizierung der cDNA von Aggrecan:

5' Aggrecan      atgaccactttactctgggttttcgtg  
3' Aggrecan      ttcaccctcagtgatgtttcgaggca

Oligonukleotide kodierend für Tat-NLS mit NheI und BglII kompatiblen Enden:

tat-NLS sense      cttagcaaggaagaagcggagacagcgacgaagataa  
tat-NLS antisense      gatcttatctctcgtcgtgtctccgcttctccttg

Oligonukleotide kodierend für Myc-Epitop und Hexahistidin-tag mit NdeI und XbaI kompatiblen Enden zur Gewinnung von pSW5-2:

mychis-2 sense      tatgcaaaaactcatctcagaagaggatctgaatcaccatcatcaccatcacact  
mychis-2 antisense      cttagagtgatgggtgatgatgggtgattcagatcctcttctgagatgagttttgca

## 2.1.6 Mikroorganismen

| Bakterienstämme              | Genotyp   | Referenz            |
|------------------------------|---|---------------------|
| <i>E. coli</i> XL1 blue      | <i>supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi, relA1, lac<sup>-</sup>, F'(traD36, proAB<sup>+</sup>, lacIq, lacZΔM15)</i>  | [Hanahan, 1983]     |
| <i>E. coli</i> DH5α          | F <sup>-</sup> φ80 <i>dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 phoA hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44 λ<sup>-</sup> thi-1 gyrA96 relA1</i> | Gibco-BRL           |
| <i>E. coli</i> CC118         | <i>araD139, Δ(ara, leu) 7697, thi, ΔlacX74, phoAΔ20, galE, argE<sub>a m</sub>, recA1, rpsE, rpoB</i>  | [Manoil, 1985]      |
| <i>Pichia pastoris</i> GS115 | <i>His4</i>   | [Sreekrishna, 1989] |

### 2.1.7 Zelllinien

| Zelllinie        | Gewebe  | Medium                                 | Referenz / ATCC-Nr.    |
|------------------|---|--|------------------------|
| A-431            | humanes epidermoides Vulvakarzinom  | DMEM                                   | CRL-1555               |
| HeLa             | humanes Cervix-Adenocarcinom  | DMEM                                   | CCL-2                  |
| MDA-MB 453       | humanes Mamma-Adenokarzinom   | DMEM                                   | HTB-131                |
| MDA-MB 468       | humanes Mamma-Adenokarzinom   | DMEM                                   | HTB-132                |
| SKBR-3           | humanes Mamma-Adenokarzinom   | DMEM                                   | HTB-30                 |
| Renca-lacZ       | murines Nierenkarzinom, stabil transfiziert mit <i>lacZ</i> cDNA                          | RPMI; 0,2 mg/ml Zeozin                 | [Maurer-Gebhard, 1998] |
| Renca-lacZ/ErbB2 | murines Nierenkarzinom, stabil transfiziert mit <i>lacZ</i> und humaner <i>ErbB2</i> cDNA | RPMI; 0,2 mg/ml Zeozin; 0,5 mg/ml G418 | [Maurer-Gebhard, 1998] |
| COS-1            | SV40-transformierte Affen-Nierenfibroblasten ( <i>Cercopithecus Aethiop</i> )             | DMEM                                   | CRL-1650               |

## 2.2 Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurden die molekularbiologischen Methoden sowie die gängigen Puffer aus Sambrook *et al.*, 1989 [Sambrook, 1989] entnommen. Die aufgeführten Lösungen wurden, wenn nicht gesondert angegeben, in Reinstwasser angesetzt (H<sub>2</sub>O bidest.).

### 2.2.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Amplifizierung von Plasmid-DNA in *E. coli*

##### *Anzucht und Stammhaltung von Bakterien*

###### **Material:**

LB-Medium: 5 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O  
 Glycerin: 87%  
 Ampicillin: 100 mg/ml in H<sub>2</sub>O

###### **Durchführung:**

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Stammhaltung von *E. coli* Zellen erfolgte in LB-Glycerinkulturen bei -80°C. Dazu wurde ein Volumenteil einer exponentiell wachsenden LB-Flüssigkultur mit einem Volumenteil 87% Glycerin versetzt.

Bakterienkulturen wurde in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37°C auf dem Schüttler (250 Upm) über Nacht angezogen.

##### *Herstellung kompetenter E. coli Zellen*

###### **Material:**

Lösung I: 150 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM CoAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>;  
 13% Glycerin; pH 5,8; sterilfiltriert  
 Lösung II: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 13% Glycerin; pH 7,0;  
 sterilfiltriert

###### **Durchführung:**

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5 herangezogen und anschließend bei 4°C für 10 min. bei 2200 Upm in einem JA-10 Rotor (Beckmann) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und 1-2 Std. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet in 12,5 ml eiskalter Lösung II resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu 250 µl schockgefroren und bei -80°C gelagert.

##### *Transformation von Plasmid-DNA in E. coli*

LB amp Agar Platten: 5 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; H<sub>2</sub>O ad 1000 ml; 1,5% (w/v) Agar; autoklavieren, abkühlen auf 50-60°C  
 100 µg/ml Ampicillin

Kompetente *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. der Hälfte eines Ligationsansatzes vermischt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden einem Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden unterzogen und anschließend auf Eis gelagert. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten (mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Transformanten wurden über

Ampicillin-Resistenz selektioniert und im „Mini-Screen“ (2.2.1.2) identifiziert.

### 2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

#### *Präparation von Plasmid DNA aus E. coli für analytische Zwecke ("Mini-Screen")*

##### **Material:**

|                    |   |
|--------------------|---|
| LB-Medium:         | s. 2.2.1.1  |
| Ampicillin:        | 100 mg/ml   |
| NaOH/SDS-Lsg.:     | 0,2 M NaOH; 1% SDS (w/v)  |
| Natriumacetat:     | 3 M Natriumacetat (pH 5,5)  |
| Phenol/Chloroform: | 50% (v/v) Phenol; 49% (v/v) Chloroform<br>1% (v/v) Isoamylalkohol |
| Tris:              | 10 mM pH 8,0  |
| RNase-Lsg.:        | 0,1 mg/ml RNase A in 5 mM Tris-HCl (pH 8,0)                       |
| Ethanol:           | 100%; 70% (v/v)   |

##### **Durchführung:**

Je 5 ml LB-Medium (mit 100 µg Ampicillin/ml) wurden mit einem über Antibiotikaresistenz vorselektionierten Bakterienklon beimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler (250 Upm) inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde in einer Tischzentrifuge (14000 Upm) abzentrifugiert und in je 100 µl H<sub>2</sub>O bidest. resuspendiert. Durch Zugabe von je 200 µl der NaOH/SDS-Lösung und Inkubation der Proben für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Zum Neutralisieren wurden je 150 µl Natriumacetatlösung zugegeben, die Proben wurden vorsichtig gemischt und für weitere 5 Minuten inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation wurde der plasmidhaltige Überstand abpipettiert und mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform extrahiert. Die DNA wurde schließlich aus der wässrigen Phase mit zwei Volumenteilen Ethanol p. a. gefällt, 30 Minuten abzentrifugiert und das Sediment mit Ethanol (70%) gewaschen. Das Präzipitat wurde schließlich in 39 µl Tris-Lösung, 1 µl RNase-Lösung resuspendiert. 5 bis 10 µl dieser Plasmid-DNA-Lösung wurden dann pro Restriktionsanalyse eingesetzt.

Alternativ wurde der „Miniprep“ Plasmidextraktionskit der Firma Qiagen nach der Vorschrift des Herstellers verwendet.

#### *Präparative Isolierung von Plasmid-DNA*

Größeren Mengen Plasmid-DNA (2-5 mg) wurden mit dem DNA-Maxi-Präparations-Kit von Qiagen nach Vorschrift des Herstellers präpariert.

#### *Bestimmung der Konzentration von DNA*

Die Bestimmung von DNA-Konzentrationen erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten. Nach Chargaff (1955) entspricht eine  $OD_{260}=1$  einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml und 37 µg/ml einzelsträngiger DNA.

### 2.2.1.3 Herstellung von cDNA aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) oder Gewebekulturzellen

##### **Material:**

|                |  |
|----------------|--|
| Ficoll-Hypaque | (Pharmacia)  |
| PBS:           | 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;<br>pH 7,4 |

### **Präparation von PBMCs**

Die Präparation von PBMCs wurde nach den Current Protocols Immunology durchgeführt. 25 ml mit Heparin versetztes Blut wurden mit 25 ml PBS gemischt, auf zwei 50 ml Falcon Gefäße aufgeteilt und mit je 10 ml Ficoll-Hypaque Lösung unterschichtet. Durch Zentrifugation (30 min., 2000 Upm; langsames Abbremsen; Sorvall Tischzentrifuge) wurde ein Dichtegradient erzeugt, in dem die verschiedenen Blutzellen aufgetrennt werden. Die Lymphozyten waren als trüber Ring über der Ficoll-Phase sichtbar und wurden vorsichtig mit einer Pipette abgesogen, in ein neues Gefäß überführt und dreimal mit PBS gewaschen, wobei jeweils 10 min. bei 1300 Upm abzentrifugiert wurde.

### **Isolierung von Gesamt-RNA mit RNeasy total RNA Mini kit (Qiagen)**

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus den PBMCs oder aus etablierten Gewebekultur-Zelllinien wurde mit dem RNeasy total RNA purification kit der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Sofern im Handbuch nicht anders angegeben, wurden  $5 \times 10^6$  Zellen je Zelllinie verwendet. Zum Homogenisieren wurden die Zellen in Puffer RLT mehrfach durch eine dünne Kanüle in eine 1 ml Insulin-Spritze aufgezogen.

### **Synthese von cDNA**

An der GesamtRNA wurde mithilfe des First stand cDNA Synthesis kits (Pharmacia) und poly-dT primern cDNA synthetisiert. 8 µl der wie oben beschrieben isolierten GesamtRNA wurden für 10 min. auf 65°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und auf Eis gelagert. Zu der RNA wurden 5 µl Reaktionspuffer (mit Enzym), 1 µl DTT-Lösung sowie 0,2 µg poly-dT primer pipettiert und der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die so hergestellte cDNA diente als template in nachfolgenden PCR Reaktionen.

#### **2.2.1.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Perkin Elmer 9600 Thermocycler. Die meisten Reaktionen wurden mit dem Qiagen PCR kit und Taq DNA Polymerase durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl bestehend aus der DNA-Matrize, 1 U Vent DNA Polymerase (New England Biolabs) oder Taq DNA Polymerase (Qiagen), Vent bzw. Taq DNA Polymerasepuffer, je 25 pmol Oligonukleotidprimer und je 200 µM der Desoxyribonukleotide. Die Polymerase wurde erst nach 5 minütiger Denaturierung der DNA-Matrize bei 94°C zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurde die Denaturierung 1 min. bei 94°C, die Hybridisierung der Oligonukleotide für 1 min. bei der angegebenen Temperatur und die Polymerasereaktion 1 min. je kb zu amplifizierende DNA bei 72°C in 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

#### **One step RT-PCR (QIAGEN) zum Nachweis von AggreCAN mRNA in Lysaten von Zellkulturen**

Die RT-PCR und nachfolgende PCR zur Amplifizierung der cDNA wurde mit spezifischen primern unter Verwendung des one step RT-PCR kits der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als template wurden je 1 µl der wie unter 2.2.1.3 beschrieben präparierten Gesamt-RNA aus etablierten Tumorzelllinien eingesetzt. Die PCR wurde 1 min. bei 94°C, 1 min. bei 57°C und 2 min. bei 72°C in 35 Zyklen mit den AggreCAN-spezifischen primern „5' AggreCAN“ und „3' AggreCAN“ durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Qualität der Gesamt-RNA wurde außerdem mit den Caspase-3-spezifischen primern „5' BamHI, NdeI Casp3“ und „3' SacI, XbaI Casp3“ die vollständige cDNA von Caspase-3 bei einer Hybridisierungstemperatur von 52°C amplifiziert.

### 2.2.1.5 Subklonierung von DNA-Fragmenten

#### *Schneiden mit Restriktionsenzymen*

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt 1-5 µg Plasmid DNA sowie 5-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20-50 µl. Zur Vermeidung von unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym wurden Volumen und Enzymmenge so gewählt, daß der Restriktionsansatz nicht mehr als 5% Glycerin enthielt. Die Inkubationszeit betrug üblicherweise 1-3 Std. bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend durch Elektrophorese in Agarose- oder Polyacrylamidgelen wie unter 2.2.2.1 bzw. 2.2.2.2 beschrieben aufgetrennt und gegebenenfalls nach 2.2.1.6 aus Agarosegelen eluiert.

#### *Dephosphorylierung des Vektors*

Bei der Subklonierung von DNA-Fragmenten kann ein Ringschluß des zur Ligation eingesetzten linearisierten Plasmids durch die Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen verhindert werden. Dephosphorylierungs-Reaktionen wurden üblicherweise im Anschluß an einen Restriktionsverdau durchgeführt. Dazu wurde 1 U Alkalische Phosphatase (CIP; NEBiolabs) in den für 10 min. bei 75°C inaktivierten Restriktionsansatz gegeben und dieser nochmals für 30 min. bei 37°C inkubiert. Alternativ wurde die Reaktion in dem vom Hersteller gelieferten CIP-Puffer ausgeführt.

#### *Ligationsreaktion*

Ein Reaktionsansatz enthielt ca. 200 ng der linearisierten und dephosphorylierten Vektor-DNA. Vektor-DNA und Fragment-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von ca. 1:4 für „sticky end“ Ligationen bzw. 1:1 für „blunt end“ Ligationen eingesetzt. Ligationsreaktionen erfolgten in einem Volumen von 20 µl mit dem vom Hersteller gelieferten Ligasepuffer und 1 Weiss-Einheit an T4-DNA Ligase (Boehringer Mannheim) und wurden bei 16°C über Nacht oder für 3-5 Std. bei Raumtemperatur durchgeführt. „Blunt end“ Ligationen wurden in einem Volumen von 10 µl unter Zusatz von 15% PEG 8000 über Nacht bei 16°C durchgeführt. Die Hälfte dieser Ansätze wurden anschließend für die Transformation kompetenter *E. coli* Zellen eingesetzt (2.2.1.1).

#### *„Fill-in“ Reaktion und mung bean Nuklease Verdau von DNA-Fragmenten zur Erzeugung von „blunt ends“*

Zur Erzeugung von „blunt ends“ wurden nach Restriktionsverdau entstandene überhängende DNA-Enden mit dem großen Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow) aufgefüllt oder mit „mung bean“ Nuklease verdaut. Beide Reaktionen wurden nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym im für den Restriktionsverdau verwendeten Puffer durchgeführt. Für die „fill-in“ Reaktion wurden 33 µM dNTPs sowie 1 U Klenow je µg DNA zugegeben und der Ansatz 15-30 min. bei 37°C inkubiert. Zur vollständigen Abtrennung der Polymerase wurde der Ansatz vor einem weiteren Restriktionsverdau über ein Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das DNA-Fragment von Interesse aus dem Gel eluiert. Der Nuklease Verdau wurde unter Zusatz von 1 mM ZnSO<sub>4</sub> mit 5 U „mung bean“ Nuklease für 30 min. bei 30°C durchgeführt.

### 2.2.1.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach gelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarosegel (2.2.2.1) und Färbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde die unter UV-Licht (365nm) sichtbare DNA-Bande von Interesse ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit einem QIAex-Gel-Extraktions-Kit der Firma Qiagen nach Vorschrift des Herstellers.



### 2.2.1.7 Transformation von DNA-Konstrukten in *Pichia pastoris* (Elektroporation)

Die folgenden Protokolle sind im Wesentlichen dem Handbuch des „*Pichia* Expression kit“ (Invitrogen) entnommen.

#### Material:

YPD-Medium: 1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 2% Glucose; für Platten außerdem 2% Agar  
 MD-Platten: 1,34% Yeast Nitrogen Base (mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  / ohne Aminosäuren);  
 $4 \times 10^{-5}$  M Biotin; 1% Glucose; 1,5% Agar  
 Sorbitol: 1 M in  $\text{H}_2\text{O}$

#### Anzucht und Lagerung des Hefestammes *Pichia pastoris* GS115

Die routinemäßige Anzucht und Lagerung erfolgte in Antibiotika-freiem YPD-Flüssigmedium bzw. auf YPD-Agarplatten bei 30°C. Nach Transformation wurden die Hefen auf Histidin-freiem Minimalmedium (MD-Agar) selektioniert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden YPD-Kulturaliquots mit 40% Glycerin bei -80°C eingefroren.

#### Herstellung kompetenter Hefen

50 ml YPD-Medium wurden mit einer in 5 ml über Nacht gezogenen Vorkultur so beimpft, daß die  $\text{OD}_{600}$  0,2-0,3 betrug. Diese Kultur wurde bei einer  $\text{OD}_{600}$  von ca. 1,5 abzentrifugiert (1500xg). Das Pellet wurde zweimal mit 40 ml eiskaltem Wasser sowie 25 ml kalter Sorbitol-Lösung gewaschen und schließlich in 1 ml Sorbitol-Lösung resuspendiert. Bis zur Verwendung wurden die Hefezellen auf Eis gelagert.

#### Elektroporation

20 µg Plasmid-DNA wurden zunächst mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (pPIC9Δ[GrBmh], pPIC9Δ[GrB-5mh], pPIC9Δ[GrB-DT-5mh], pPIC9Δ[GrBmh-tatNLS] sowie pPIC9[GrBmh] mit SalI, pPIC9Δ[GrB S183Amh] mit StuI), zur Abtrennung des Enzyms mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die in 10 µl  $\text{H}_2\text{O}$  wieder gelöste linearisierte DNA wurde mit 100 µl Zellsuspension in einer 0,2 cm Elektroporationsküvette (Invitrogen) gemischt und 5 min. auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser der Firma Biorad bei 1500 V, 25 µF und 200 W ausgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml kalter Sorbitol-Lösung aufgenommen, 300 µl der Zellsuspension wurden auf Histidin-freien MD-Platten ausgestrichen und bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert.

#### Nachweis der genomischen Integration von cDNA-Konstrukten in transformierten *Pichia* Klonen

Um die Integration der rekombinanten DNA-Konstrukte in das Hefegenom nachzuweisen, wurden mehrere Klone je Transformationsansatz mithilfe der Polymerase Kettenreaktion (über PCR) analysiert. Dazu wurden 5 ml YPD-Kulturen der einzelnen Klone über Nacht herangezogen. Jeweils 100 µl dieser Kulturen wurden durch Zugabe von je 20 µl 0,05 N NaOH-Lösung und Inkubation für 5 min. lysiert und mit je 2 µl 0,5 M HCl-Lösung neutralisiert. Für die PCR wurden je 4 µl dieser aufgeschlossenen Kulturen als template eingesetzt. Als primer wurden die unter 2.1.5 aufgeführten 5' und 3' AOX Oligonukleotide verwendet. Die damit synthetisierten PCR-Produkte sind aufgrund der Vektor-kodierten flankierenden AOXI-Sequenzen um 492 bp größer als die klonierten cDNA-Konstrukte. Sofern das Konstrukt von Interesse nicht in den AOXI-Lokus rekombiniert wurde, entsteht außerdem ein 2,2 kb PCR-Produkt des endogenen AOXI-Gens. Die Hybridisierung der primer wurde bei 48-52°C für 1 Min., die Polymerasereaktion 90 Sek. bei 72°C und die Denaturierung 1 min. bei 95°C in 30 Zyklen durchgeführt.

## 2.2.2 Gelelektrophoretische Methoden

### 2.2.2.1 Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

**Material:**

|                   |   |
|-------------------|---|
| Agarose           |   |
| 1x TAE-Puffer:    | 40 mM Tris; 20 mM HAc (Eisessig); 1 mM EDTA; pH 7,2   |
| 10x Probenpuffer: | 40% (w/v) Saccharose; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol in H <sub>2</sub> O |
| Ethidiumbromid:   | 1 µg/ml in H <sub>2</sub> O   |
| Geltyp:           | Flachbett "Mini"-Gele (100 mm x 75 mm x 5 mm)   |
| Lauf:             | 0,5-1 Stunde bei 100-150 V  |

**Durchführung:**

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung großer DNA-Fragmente (> 200 bp) dienen native Agarosegele. Die Elektrophorese erfolgte je nach Trennproblem in Gelen mit einem Agarosegehalt von 0,8-2,0% (w/v) unter Zusatz von 0,5 µl Ethidiumbromidlösung je 100 ml Gellösung in TAE-Puffer.

### 2.2.2.2 Native Polyacrylamidgele für DNA-Analysen

**Material:**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung: | 30% (w/v) : 1% (w/v)                            |
| 10x TBE-Puffer:                | 900 mM Tris; 900 mM Borsäure; 1 mM EDTA; pH 7,2 |
| 10x Probenpuffer:              | s. 2.2.2.1                                      |
| TEMED                          |   |
| APS:                           | 10% (w/v) in H <sub>2</sub> O                   |
| Laufpuffer:                    | 1x TBE-Puffer                                   |
| Geltyp:                        | vertikales Mini-Gel (100 mm x 80 mm x 1,5 mm)   |
| Lauf:                          | 1-3 Stunden bei 60 mA                           |

**Durchführung:**

Zur Größenbestimmung kleiner DNA-Fragmente (< 200 bp) wurden native 10% Polyacrylamidgele verwendet. Dazu wurden 3,3 ml AA/BA-Lösung, 5,5 ml H<sub>2</sub>O und 1 ml 10x TBE gemischt, durch Zugabe von 5 µl TEMED und 200 µl APS zur Polymerisation gebracht und zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Restriktionsansätze wurden in 10x Probenpuffer aufgetragen, und DNA Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit Ethidiumbromid (Färbebad 1 µg/ml für 15-30 Min.) angefärbt (2.2.1.6).

### 2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli und Färbung mit Coomassie und mit Silber nach Morrissey

**Material :**

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung .: | 30% (w/v) : 0,8% (w/v)                                 |
| Tris-HCl:                         | 1,5 M pH 8,6   |
| Tris-HCl:                         | 0,5 M pH 6,8   |
| SDS-Lösung:                       | 10% (w/v) in H <sub>2</sub> O                          |
| APS:                              | (Ammoniumperoxodisulfat) 10% (w/v) in H <sub>2</sub> O |
| TEMED                             |  |

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Geltyp:                 | vertikales Minigel (100mm x 80mm x 1,5mm)   |
| Gelkammer:              | Mini-Protean II (Biorad)  |
| 5xLaemmli-Probenpuffer: | 250 mM Tris-HCl pH 6,8; 50% Glycerin; 50% SDS (w/v);<br>0,5% Bromphenolblau (w/v); 2% DTT |
| Elektrophoresepuffer:   | 25 mM Tris-HCl; 250 mM Glycin; 0,1% SDS (w/v); pH 8,3                                     |
| Färbelösung 1:          | 0,15% Coomassie Blue R250 (w/v); 50% Ethanol (v/v);<br>10% Essigsäure (v/v)               |
| Fixierlösung 1:         | 50% Ethanol (v/v); 10% Essigsäure (v/v)   |
| Fixierlösung 2:         | 5% Ethanol (v/v); 7% Essigsäure (v/v)   |
| Reduktionslösung:       | 2,5% Glutaraldehyd (v/v)  |
| Färbelösung 2:          | 0,1% AgNO <sub>3</sub> (w/v)  |
| Entwickler:             | 3% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (w/v); 0,05% Formaldehyd                               |
| Stop-Lösung:            | 10% Essigsäure (v/v)  |

#### **Durchführung:**

Ein 15% bzw. 12,5% SDS-Gel enthielt:

|                   | <b>Trenngel</b> |         | <b>Sammelgel</b> |
|-------------------|-----------------|---------|------------------|
|                   | 15%             | 12,5%   | 5%               |
| AA/BA:            | 4 ml            | 3,32 ml | 0,4 ml           |
| 1,5 M Tris:       | 2 ml            | 2 ml    | -                |
| 0,5 M Tris:       | -               | -       | 1 ml             |
| H <sub>2</sub> O: | 2 ml            | 2,66 ml | 2,6 ml           |
| SDS-Lösung:       | 80 µl           | 80 µl   | 40 µl            |
| APS:              | 80 µl           | 80 µl   | 40 µl            |
| TEMED:            | 8 µl            | 8 µl    | 4 µl             |

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei 120 V, im Trenngel bei 170 V durchgeführt. Zur Detektion der aufgetrennten Proteine wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung auf dem Schüttler gefärbt und anschließend in 30% Ethanol (v/v) / 10% Essigsäure (v/v) entfärbt.

Bei Proteinmengen unter 200 ng wurde eine Silberfärbung modifiziert nach Morrissey (1981) durchgeführt. Dazu wurden die SDS-Gele jeweils 30 Minuten in Fixierlösung 1, Fixierlösung 2 sowie der Reduktionslösung geschwenkt und anschließend mit bidestilliertem Wasser unter mehrfachem Wechsel sehr gut gewaschen. Proteine wurden durch 30 minütige Inkubation in Silbernitrat-Färbelösung angefärbt, die Gele wurden nochmals kurz mit Wasser gewaschen und die Detektion der Banden erfolgte durch Zugabe von Entwickler. Sobald die Proteine als dunkelbraune bis schwarze Banden sichtbar waren, wurde die Reaktion mit Stop-Lösung beendet.

## **2.2.3 Arbeiten mit Proteinen**

Native oder renaturierte gereinigte Proteine, Bakterienpellets von Expressionskulturen sowie proteinhaltige Reinigungsfraktionen wurden bei -80°C gelagert, denaturierte Proteinfractionen bei 4°C. Alle Arbeiten mit nativen Proteinen wurden sofern möglich bei 4°C durchgeführt.

### **2.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

#### **Material:**

|             |  |
|-------------|--|
| LB Medium:  | s. 2.2.1.1   |
| Ampicillin: | 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O; Gebrauchskonzentration: 100 µg/ml |
| IPTG:       | 0,5 M in H <sub>2</sub> O  |

### **Durchführung:**

Die Expression rekombinanter Proteine wurde, sofern nicht anders angegeben, im *E. coli*-Stamm XL1 blue durchgeführt, der mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transformiert war. In 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium wurden Übernachtskulturen aus einzelnen Bakterienklonen bei 37°C herangezogen. Mit diesen Kulturen wurden am nächsten Tag jeweils 900 ml LB-Medium (mit Ampicillin 100 µg/ml) beimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG induziert, und die Kulturen wurden üblicherweise weitere 1-3 Std. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend für 10 min. bei 5000 Upm in JA-10 Rotoren (Beckmann) abzentrifugiert und die Pellets entweder lysiert oder bis zur Isolierung der rekombinanten Proteine bei -80°C gelagert.

Zur Analyse der Proteinexpression über SDS-PAGE und Western blot wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 1 ml Kultur entnommen, 1 min. bei 14000 Upm in einem Eppendorf tube abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Von dem Lysat wurden 10 bis 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen.

### **2.2.3.2 Periplasmapräparation aus *E. coli* Expressionskulturen**

#### **Material:**

|               |                                     |
|---------------|-------------------------------------|
| Waschpuffer:  | 10 mM Tris pH 8,0                   |
| Schockpuffer: | 30 mM Tris, 20 % Saccharose; pH 8,0 |
| EDTA-Lösung:  | 500 mM pH 8,0                       |

Das *E. coli* Cytolysin ClyA wurde in *E. coli* mithilfe des bakteriellen, auf pUC18 basierenden Expressionsvektors pAL201 [Ludwig, 1999] überexprimiert und im periplasmatischen Raum akkumuliert. Die Reinigung der periplasmatischen Proteine erfolgte wie in [Ludwig, 1999 #8] beschrieben: 10 ml einer DH5α Übernachtskultur, die mit pAL201 transformiert war, wurden 10 min. bei 4°C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit je 5 ml 10 mM Tris pH 8 gewaschen und schließlich in 2,5 ml Schockpuffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurden mit 5 µl EDTA-Lösung versetzt, unter Schütteln 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und erneut abzentrifugiert. Zur osmotischen Lyse der Bakterien wurde das Pellet in 10 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert, 10 min. auf Eis inkubiert und 10 min. bei 4°C und 10000 Upm in einem JA-20 Rotor (Beckmann) abzentrifugiert. Der Überstand, der die periplasmatischen Proteine enthielt, wurde vorsichtig abpipettiert, durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert bzw. als möglicher Ersatz für Perforin in MTT-Zytotoxizitätstests eingesetzt.

### **2.2.3.3 Expression rekombinanter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris***

Die folgenden Protokolle sind im Wesentlichen dem Handbuch des „*Pichia* Expression kit“ (Invitrogen) entnommen.

Rekombinante Proteine wurde mithilfe des Vektors pPIC9 exprimiert und anschließend ins Medium sekretiert.

#### **Material:**

|              |   |
|--------------|---|
| BMGY-Medium: | 1% Hefeextrakt; 2% Pepton; 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5;<br>1,34% Yeast Nitrogen Base (mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / ohne Aminosäuren);<br>4x10 <sup>-5</sup> M Biotin; 1% Glycerin |
| BMMY-Medium: | wie BMGY, jedoch 0,5% Methanol statt 1% Glycerin  |

### **Expressionsstudien**

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Hefeklone, die mit dem gewünschten DNA-Konstrukt transformiert und auf Histidin-freiem Minimalmedium vorselektioniert waren, im kleinen Maßstab

angezogen. Dazu wurden je 6 ml BMGY-Medium mit einem Hefeklon von MD-Platten beimpft und die Kultur bei 30°C 2 Tage geschüttelt. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Kulturen bei 3000xg abzentrifugiert und in Methanol-haltigem BMMY-Medium resuspendiert. Alle 24 Std. wurden zusätzlich 2% Methanol Endkonzentration zugegeben. Die Kulturen wurden weitere 3-5 Tage inkubiert, wobei zu Beginn der Induktion sowie alle 24 Std. je 200 µl zur Analyse der Proteinexpression entnommen wurden. Die Hefen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei 16000 Upm in einer Tischzentrifuge für 10 min. abzentrifugiert und sekretierte rekombinante Proteine in den Überständen durch SDS-PAGE und Western blot nachgewiesen.

#### **Präparative Expression von Proteinen in *P. pastoris***

Im präparativen Maßstab wurden rekombinante Proteine in 250 ml *Pichia*-Kulturen exprimiert. Dazu wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur in BMGY-Medium bei 30°C über Nacht herangezogen, die zum Animpfen einer weiteren 50 ml Vorkultur verwendet wurde. Diese wurde ebenfalls über Nacht inkubiert und zur Induktion der Proteinexpression am nächsten Tag in 200 ml BMMY-Medium überführt. Die Expressionskultur wurde weitere 2-3 Tage bei 30°C inkubiert, wobei alle 24 Std. Methanol zu einer Endkonzentration von 2% zugegeben wurde. Die Kultur wurde schließlich bei 6000 Upm in einem JA-10 Rotor abzentrifugiert und das Protein von Interesse aus dem Überstand durch Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt oder der Überstand bis zur Isolierung des rekombinanten Proteins bei -80°C gelagert.

#### **2.2.3.4 Immunisierung von Balb/c Mäusen zur Gewinnung von anti-Granzym B Antiserum**

Zur Gewinnung von anti-Granzym B Antiserum wurden drei Balb/c Mäuse intraperitoneal mit GST-GrB behandelt, das denaturierend über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend durch Dialyse gegen PBS mit 400 mM L-Arginin und 10% Glycerin renaturiert worden war. Je 20 µg GST-GrB in 100 µl wurden an den Tagen 1,3,7,14 und 22 in die Bauchhöhle der Mäuse injiziert. Am Tag 33 wurden die Tiere zur Entnahme des Blutes getötet. Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation abgetrennt und das Serum im Western blot auf die Bindung von Granzym B, GST bzw. unspezifischer Proteine untersucht.

#### **2.2.3.5 Immunodetektion von Proteinen (Western blot)**

##### **Material:**

|                    |   |
|--------------------|---|
| Immobilon P (PVDF) |   |
| Transfer Membran   | (Millipore)   |
| Kathodenlösung:    | 25 mM Tris; 40 mM 6-Aminohexansäure; 20% (v/v) Ethanol                        |
| Anodenlösung I:    | 30 mM Tris; 20% (v/v) Ethanol   |
| Anodenlösung II:   | 300 mM Tris; 20% (v/v) Ethanol  |
| TTBS:              | 10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20                              |
| Blocking-Lösung:   | 5% Magermilchpulver in TTBS   |
| AP-Puffer:         | 100 mM Tris (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>                     |
| NBT-Lösung:        | 0,5 g Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid (NBT) in 10 ml 70% Dimethylformamid (DMF) |
| BCIP-Lösung:       | 0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-indoyl Phosphat (BCIP) in 10 ml Dimethylformamid       |
| AP-Substratlösung: | 66 µl NBT-Lösung, 33 µl BCIP Lösung, 10 ml AP-Puffer                          |
| Stripping buffer:  | 2% (w/v) SDS; 100 mM DTT  |

##### **Durchführung:**

Die nach 2.2.2.3 aufgetrennten Proteine wurden in Halbtrockenblotkammern von Froebel (Lindau) auf Immobilon-P Membranen von Millipore übertragen (Blotaufbau: Drei Lagen Whatman 3MM Papier

in Anodenpuffer I, drei Lagen in Anodenpuffer II, Membran, SDS-Polyacrylamidgel, drei Lagen Whatman 3MM Papier in Kathodenpuffer). Die Membran wurde vorher kurz in Methanol und anschließend in Anodenpuffer II getränkt. Die Elektrophorese wurde für 50 min. bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche durchgeführt.

Die folgenden Antikörper und Nachweisreagenzien wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

| <b>Antikörper:</b>                      | <b>Konzentration:</b> | <b>Verdünnung:</b> |
|---|-----------------------|--------------------|
| anti-Myc 9E10 (Myc-Epitop)              | 1,6 µg/ml             | 1:500              |
| SWA11 (SWA11-Epitop)                    | 0,6 µg/ml             | 1:1000             |
| anti-Granzym B 2C5                      | 200 µg/ml             | 1:1000             |
| anti-Caspase-3 E-8                      | 200 µg/ml             | 1:1000             |
| anti-Glutathion-S-Transferase           |                       | 1:1000             |
| Ziege anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt      |                       | 1:5000             |
| Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt |                       | 1:10000            |
| Schaf anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt     |                       | 1:7000             |
| Streptavidin AP-gekoppelt               |                       | 1:5000             |

Zur Absättigung der auf der Polyvinyliden Fluorid (PVDF)-Membran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die zu analysierenden Membranen 30-60 min. mit Blockinglösung inkubiert und anschließend je dreimal 2-5 min. mit TTBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in Blockinglösung erfolgte für 60 min. bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht, die Inkubation mit dem zweiten, enzymkonjugierten Antikörper ebenfalls in Blockinglösung für 30-60 min. Zwischen sowie nach beiden Inkubationsschritten wurde die Membran wie zuvor mit TTBS gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden bei Verwendung von HRP-gekoppelten Zweitantikörpern mithilfe des ECL-Chemolumineszenz-Systems (Amersham) nach Herstellervorschrift nachgewiesen und durch Auflegen eines Röntgenfilms für 1 bis 60 Minuten visualisiert.

Bei Verwendung von AP-gekoppelten Zweitantikörpern wurde die Membran in Substratlösung inkubiert, bis Banden sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM EDTA-Lösung gestoppt.

#### ***Entfernen von Antikörper-Komplexen von der PVDF-Membran***

Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Inkubation der Western blot Membran in 2% SDS und 100 mM DTT bei 70°C für 1-2 Stunden gelöst und gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Die Membran wurde danach wie oben beschrieben mit TTBS gewaschen und mit Blocking-Lösung für eine Stunde geblockt. Anschließend konnte die Membran mit einem anderen Antikörper erneut inkubiert werden.

### **2.2.3.6 Reinigung rekombinanter His-tag-Fusionsproteine über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie**

#### **Material:**

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Puffer A:                    | 8 M Harnstoff; 50 mM Tris; 250 mM NaCl; pH 8,0  |
| Puffer B:                    | wie A, zusätzlich 1 M Imidazol  |
| Puffer C:                    | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 300 mM NaCl; pH 8,5  |
| PBS:                         | 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 8,0 |
| PBS/Imidazol:                | PBS mit 1 M Imidazol, pH 8,0  |
| NiSO <sub>4</sub> :          | 0,2 M in H <sub>2</sub> O   |
| EDTA:                        | 100 mM in H <sub>2</sub> O, pH 8,0  |
| chelatisierende<br>Sephrose: | (Pharmacia)   |

**Durchführung:**

Alle in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine enthalten am N- oder C-Terminus Hexahistidin-tags, die eine Reinigung über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie erlauben. Zur Reinigung wurde mit  $\text{Ni}^{2+}$ -beladene chelatisierende Sepharose (Pharmacia) in Pharmacia C10/10 Säulen verwendet, üblicherweise mit einem Bettvolumen von 2 ml. Reinigungen unter denaturierenden Bedingungen wurde bei Raumtemperatur mit einer FPLC-Anlage (Pharmacia) durchgeführt. Lösliche Proteine aus *E. coli* oder *Pichia pastoris* wurden unter nativen Bedingungen bei 4°C mit einer FPLC- oder Äkta-FPLC-Anlage (Pharmacia) gereinigt.

**Denaturierende Reinigung von Proteinen aus *E. coli***

Bakterienpellets aus 1 l Expressionskulturen wurden in 35 ml Puffer A resuspendiert und mit einer „French Press“ aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 30 min. bei 20000 Upm und 4°C in JA-20 Rotoren (Beckmann) abgetrennt. Der Überstand wurde anschließend nochmal durch einen Faltenfilter filtriert und auf eine mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladene und mit Puffer A äquilibrierte Säule aus chelatisierender Sepharose mit 0,5 ml/min aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer A gewaschen, bis kein Protein mehr durch Extinktionsmessung bei 280 nm im Durchfluß nachgewiesen werden konnte. Gebundenes Protein wurden in zwei Schritten mit 20 bzw. 250 mM Imidazol eluiert. Auftrag, Durchfluß und Eluatfraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Säule wurde durch Waschen mit EDTA-Lösung und Wasser regeneriert.

**Native Reinigung von Proteinen aus *E. coli***

Die Reinigung löslicher Proteine aus *E. coli* Expressionskulturen wurde wie oben beschrieben mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Die Bakterien wurden in Puffer C mit einer „French press“ aufgeschlossen. Zum Solubilisieren der Proteine wurde anschließend 1% Triton X-100 zugegeben und die Suspension 30 min. auf einem Rollenmischer inkubiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation wurden native Proteine in Puffer C auf die Säule aufgetragen. Zum Äquilibrieren und Waschen des Säulenmaterials wurde ebenfalls Puffer C verwendet. Gebundene Proteine wurden mit 20, 50 und 250 mM Imidazol in Puffer C in drei Stufen eluiert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C ausgeführt.

**Native Reinigung von Proteinen aus *Pichia pastoris* über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie**

In der Hefe *Pichia pastoris* exprimierte His-tag Fusionsproteine wurden als lösliche Proteine ins Kultur-Medium sekretiert und konnten direkt aus *Pichia* Kulturüberständen gereinigt werden. In den Überständen der bei 6000 Upm abzentrifugierten Expressionskulturen wurde durch Zugabe von 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  oder 1 M NaOH-Lösung ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Unlösliche Bestandteile wurden durch nochmalige Zentrifugation bei 20000 Upm (JA-20 Rotor) und Filtration durch einen Sterilfilter (0,2 µm) abgetrennt. Die so vorbereitete Proteinlösung wurde in Aliquots von 50-100 ml mit 0,5 ml/min auf eine 2 ml-Säule aus chelatisierender Sepharose aufgetragen, die mit  $\text{Ni}^{2+}$  beladen und mit PBS äquilibriert war. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit PBS von der Säule gewaschen, gebundene Proteine mit 20 bzw. 250 mM Imidazol in PBS eluiert. Die Ausgangslösung sowie alle Reinigungsfraktionen wurden über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western blot analysiert. Fraktionen, die das rekombinante Protein enthielten, wurden gegebenenfalls mit PEG 35000 (Polyethylenglycol) konzentriert und gegen PBS dialysiert.

**2.2.3.7 Renaturierung von Proteinen**

Die Renaturierung von in Harnstoff-Puffer gereinigten Proteinen wurde sofern nicht anders angegeben durch Dialyse gegen PBS bei 4°C durchgeführt. Um ein Ausfallen des Proteins zu verhindern, wurden dem Dialysepuffer zunächst 400 mM L-Arginin zugesetzt, das dann durch schrittweise Verdünnung wieder entfernt wurde. Variationen dieses Protokolls wie Renaturierung unter reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 20 mM DTT sind an entsprechender Stelle beschrieben. Renaturierte

Proteine wurden zum Entfernen von evtl. gebildetem Präzipitat 30 min. bei 20000 Upm und 4°C in einem JA-20 Rotor (Beckmann) abzentrifugiert und aliquotiert bei -80°C gelagert.

**Renaturierung von Caspase-3 aus den p12 und p17 Untereinheiten [Rotonda, 1996]**

Renaturierungspuffer 1: 100 mM Hepes; 500 mM NaCl; 10% Saccharose;  
10 mM DTT; pH 7,4  
Renaturierungspuffer 2: wie oben mit 2 mM DTT

Die Rekonstituierung von aktiver Caspase-3 erfolgte durch gemeinsame Renaturierung der in 6 M Guanidinium-Hydrochlorid denaturierten beiden Untereinheiten p12 und p17. Dazu wurden die in 8 M Harnstoff gereinigten Caspase-3 Untereinheiten p12 und p17 zunächst gegen 6 M Guanidinium-Hydrochlorid in PBS (pH 7,4) dialysiert. Äquimolare Mengen p12 und p17 wurden anschließend in einem Dialyseschlauch gemischt und über Nacht bei 4°C gegen Renaturierungspuffer 1 und schließlich mehrere Stunden gegen Renaturierungspuffer 2 dialysiert. Ausgefallenes Protein wurde durch Zentrifugation für 5 min. bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgetrennt.

**2.2.3.8 Konzentrierung von Proteinlösungen**

Zur Konzentrierung proteinhaltiger Lösungen wurden Centricon oder Centriprep Spin-Konzentratoren der Firma Amicon nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Alternativ wurden Proteinlösungen in einem Dialyseschlauch bei 4°C in PEG 35000 (Polyethylenglykol) inkubiert, bis das gewünschte Endvolumen erreicht war. Anschließend wurde gegen PBS dialysiert.

**2.2.3.9 Abspaltung von GST aus GST-Fusionsproteinen mit Thrombin oder Faktor Xa**

**Material:**

Thrombin: (Sigma) 1 U/µl in H<sub>2</sub>O  
Thrombin-Spaltpuffer: PBS  
140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;  
pH 8,0  
Faktor Xa: (Amersham) 1 U/µl in H<sub>2</sub>O  
Faktor Xa Spaltpuffer: 50 mM Tris; 150 mM NaCl; 1 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,5

Über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigte GST-GrB-Fusionsproteine wurden zur Abspaltung von GST mit Thrombin oder Faktor Xa in dem jeweiligen Puffer mit 10 U Thrombin je 100 µg Protein (entspr. 10 facher Überschuß) oder 10 U Faktor Xa je mg Protein bei 4°C für 2 bis 16 Std. inkubiert. Die Spaltansätze wurden über SDS-PAGE und Western blot auf Vollständigkeit der Abspaltung von GST analysiert, zur Abtrennung des abgespaltenen GST über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt oder direkt in Aktivitäts-Tests eingesetzt.

**2.2.3.10 Deglykosylierung der in *P. pastoris* exprimierten Proteine**

Um nachzuweisen, daß in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiertes rekombinantes Granzym B glykosyliert ist, wurde das gereinigte Protein mit N-Glykosidase (Boehringer) behandelt und anschließend die Größe im Vergleich zu nicht behandeltem Protein auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel analysiert. Ca. 1 µg Protein in 10 µl PBS wurde mit 1 µl 10% SDS-Lösung versetzt und für 10 min. auf 95°C erhitzt. In einem Gesamtvolumen von 100 µl (PBS) wurden anschließend 1 U N-Glykosidase sowie 0,5% Triton X-100 zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert.



### 2.2.3.11 Bindungsstudien

#### *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)*

|                      |  |
|----------------------|--|
| blocking Lösung:     | 3% BSA in PBS  |
| anti-GranzymB        |  |
| Antikörper:          | 1:1000 in 0,5% BSA/PBS   |
| Ziege anti-Maus IgG, |  |
| AP-gekoppelt:        | 1:4000 in 0,5% BSA/PBS   |
| AP-Puffer:           | 100 mM Glycin; 1 mM ZnCl <sub>2</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; pH 10,4 |
| Entwicklungspuffer:  | 1 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in AP-Puffer frisch angesetzt              |

Die Bindung von biotinyliertem Granzym B an Streptavidin wurde in einem ELISA-artigen Verfahren nachgewiesen. Dazu wurden 100 ng Streptavidin (NEBiolabs) je well in einer 96 well Mikrotiterplatte (Greiner) in 100 µl PBS über Nacht bei 4°C immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden am nächsten Tag mit je 200 µl blocking Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Die zu testenden Proteine wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in einem Volumen von 50 µl in 0,5% BSA/PBS für 1-2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl PBS wurden 100 µl je well Erstantikörper zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Ansätze wurden wie zuvor gewaschen und gebundenes Protein zur Detektion mit Zweitantikörper (100 µl/well, 1 Std.) markiert. Nach erneutem Waschen wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 100 µl je well Entwicklungspuffer gestartet. Bei ausreichender Färbung der Ansätze wurde die Absorption bei 405 nm gegen die Absorption bei 490 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech) bestimmt.

#### *Durchflußzytometrie (FACS)*

Fusionsproteine, die den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) enthielten, wurden mittels Durchflußzytometrie auf Zellbindung an ErbB2 exprimierende Zellen untersucht. Dazu wurden ca. 10<sup>6</sup> der entsprechenden Zellen in einer 96 well round bottom Platte mit 1-3 µg des zu testenden rekombinanten Proteins in einem Volumen von 20 µl PBS bzw. 100 µl konzentriertem Überstand einer *Pichia* Expressionskultur, der das Protein von Interesse enthielt, für 40 min. bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden einmal mit 250 µl PBS gewaschen, für 3 min. bei 1800 Upm in einer Megafuge (Heraeus) abzentrifugiert und 30 min. bei Raumtemperatur mit 1-2 µg des entsprechenden Erstantikörpers (anti-Myc 9E10 bzw. anti-Granzym B) in 20 µl PBS inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurden gebundene Proteine durch Inkubation der Zellen (30 min.) mit 20 µl eines FITC-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörpers (Dianova), der gemäß den Angaben des Herstellers in PBS verdünnt wurde, markiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 250 µl PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und im FACScan (Beckton-Dickinson) auf Bindung der rekombinanten Proteine analysiert.

### 2.2.3.12 Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B und Caspase-3

#### *in vitro-Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 durch Granzym B*

|                  |  |
|------------------|--|
| Reaktionspuffer: | 50 mM Hepes; 100 mM NaCl; 10% Saccharose; pH 7,4 |
| DTT:             | 100 mM in H <sub>2</sub> O                       |
| Ac-IETD-CHO:     | 20 mM in DMSO                                    |

Die enzymatische Aktivität von rekombinantem Granzym B wurde anhand der Spaltung von Caspase-3 als natürlichem Substrat von Granzym B nachgewiesen. Procaspase-3 wurde dazu in *E. coli* als His-tag Fusionsprotein mit C-terminalem SWA11 Epitop exprimiert, denaturierend gereinigt und durch Dialyse gegen PBS, 10% Glycerin, 20 mM DTT bzw. 2 mM DTT in einem zweiten Schritt renaturiert. 100 ng der so hergestellten Procaspase-3 wurden je Ansatz als Substrat in Spaltreaktionen eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl in Reaktionspuffer unter Zusatz von 10 mM DTT bei 37°C über Nacht durchgeführt. Von den zu untersuchenden Granzym B Präpara-

tionen (in PBS) wurden 1-20 µl zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. Procaspase-3 bzw. die als Spaltprodukt gebildete p12 Untereinheit wurden nach Western blotting mit dem SWA11 Antikörper oder anti-Caspase-3 Antikörper detektiert. Die Spezifität der Spaltreaktion wurde durch Vorinkubation von Granzym B mit dem spezifischen Peptid-Aldehyd-Inhibitor Ac-IETD-CHO (200 µM) für 15 min. bei Raumtemperatur vor Zugabe von Procaspase-3 nachgewiesen.

#### ***Spaltung colorimetrischer Peptidsubstrate***

|                   |  |
|-------------------|--|
| Reaktionspuffer : | 50 mM Hepes; 100 mM NaCl; 10% Saccharose; pH 7,4 |
| DTT:              | 100 mM in H <sub>2</sub> O                       |
| Ac-IETD-pNA,      |  |
| Ac-DEVD-pNA:      | 20 mM in DMSO                                    |
| Ac-IETD-CHO:      | 20 mM in DMSO                                    |

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B wurde alternativ ein Peptidsubstrat (Acetyl-Ile-Glu-Tyr-Asp-*p*-Nitroanilid) verwendet, aus dem nach Spaltung durch Granzym B *p*-Nitroanilin freigesetzt wird, das eine Gelbfärbung der Lösung hervorruft. Die Reaktionen wurden in 96 well Mikrotiterplatten in einem Volumen von jeweils 100 µl in Reaktionspuffer oder PBS unter Zusatz von 10 mM DTT und 1 µl Substrat-Lösung entspr. 200 µM durchgeführt. Von den zu untersuchenden Granzym B Präparationen (in PBS) wurden 1-50 µl zugegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und die Farbentwicklung anhand der Absorption bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech) gemessen. Die Spezifität der Spaltreaktion wurde durch Vorinkubation von Granzym B mit dem spezifischen Peptid-Aldehyd-Inhibitor Ac-IETD-CHO (100 µM) für 15 min. bei Raumtemperatur vor Zugabe des Peptid-Substrats nachgewiesen.

Die enzymatische Aktivität von rekombinanter Caspase-3, die aus den beiden p12 und p17 Untereinheiten rekonstituiert wurde, wurde mithilfe eines Caspase-3-spezifischen colorimetrischen Peptidsubstrats Ac-DEVD-pNA wie für Granzym B beschrieben nachgewiesen.

#### **2.2.3.13 *in vitro* Biotinylierung von gereinigtem Granzym B aus *Pichia pastoris***

Sulfo-NHS-Biotin: (Pierce) 2 mg/100 µl

500 µg gereinigtes Granzym B in 1 ml PBS wurden mit 30 µg/ml Sulfo-NHS-Biotin (1,5 µl) versetzt und 3 Std. auf Eis inkubiert. Überschüssiges Reagens wurde anschließend durch Dialyse gegen 4x500 ml PBS bei 4°C entfernt.

### **2.2.4 Arbeiten mit Zellkulturen**

#### **2.2.4.1 Zellkultur**

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, mindestens einmal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und nach Bedarf abgelöst und verdünnt neu ausgesät. Allen Medien wurden 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penizillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Langzeitaufbewahrung der Zelllinien erfolgte bei -80°C in einem Medium aus FCS mit 10% DMSO (Fluka).

#### 2.2.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakt

Ripa-Puffer: 50 mM Tris; 120 mM NaCl; 1% Nonidet P-40; 0,5% Deoxycholat;  
0,1% SDS; pH 8,0

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Kulturen etablierter adhären wachsender Tumorzelllinien wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml RIPA-Puffer je  $10^7$  Zellen für 10 min. bei 4°C lysiert. Die Zellsuspension wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und Zellkerne sowie Zellmembranen 10 min. bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert. Die Zellextrakte wurden anschließend über SDS-PAGE und Western blotting analysiert.

#### 2.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Diagnostik Objektträger, adhäsiv Epoxy-beschichtet („8 well“) (Roth)

PBS

Formaldehyd: 4% in PBS, frisch angesetzt aus Pulver

Triton X-100: 0,1% in PBS

BSA: 3% in PBS

anti-Granzym B (Maus)

IgG: 1:200

anti-Streptavidin

Antiserum (Kaninchen): 1:6600

anti-Maus IgG, Alexa488-

gekoppelt: 1:1000

anti-Kaninchen IgG, FITC-

gekoppelt: 1:50

Eindeckmedium: Vectashield mit Propidiumjodid (Alexa)

Die Aufnahme von Proteinen in Zellen sowie deren intrazelluläre Lokalisation wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen behandelter Zellen nachgewiesen. Dazu wurden  $10^4$  bis  $4 \times 10^4$  adhären wachsende Zellen auf „8 well“ Diagnostik Objektträgern, adhäsiv Epoxy-beschichtet (Roth) in 50 µl je well ausgesät und über Nacht kultiviert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden die Objektträger in 10 cm Zellkulturschalen gelegt, die in mit Wasser gefüllte 15 cm Zellkulturschalen gestellt wurden. Zur Behandlung der Zellen mit Proteinen wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und die Proteine in der gewünschten Konzentration in Zellkulturmedium in einem Gesamtvolumen von 50 µl auf die Zellen gegeben. Um die Aufnahme der Proteine in die Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, zum Nachweis der Bindung an Zellen für 1 Std. auf Eis.

Die Zellen wurden anschließend zunächst zweimal mit PBS gewaschen, mit 40 µl Formaldehyd-Lösung je well 10 min. bei Raumtemperatur fixiert, erneut gewaschen, mit Triton X-100-Lösung (20 µl/well) 5 min. permeabilisiert und nochmal gewaschen. Zum Nachweis von Granzym B wurde der anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) eingesetzt, zur Detektion von Streptavidin-Komplexen Streptavidin-Antiserum jeweils in der angegebenen Verdünnung in 3% BSA/PBS. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem spezifischen Erstantikörper inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit Alexa488-gekoppeltem anti-Maus IgG (Molecular Probes) bzw. FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG (Dianova) ebenfalls verdünnt in 3%BSA/PBS für eine weitere Stunde inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen mit Vectashield Eindeckmedium, das Propidiumjodid zum Anfärben der Zellkerne enthält, eingedeckt und unter einem Fluoreszenzmikroskop bzw. Konfokalmikroskop (Nikon) analysiert.

#### 2.2.4.4 Zytotoxizitätstest (MTT)

MTT: (Sigma) 7,5 mg/ml in PBS  
 Lysepuffer: 20% SDS in 50% Dimethylformamid; 50% H<sub>2</sub>O; pH 4,7 einstellen mit 80% Eisessig / 20% 1 M HCl

Die zytotoxische Wirkung der in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine wurde anhand der Überlebensrate von etablierten Tumorzellen nach Behandlung mit diesen Proteinen untersucht. Zur Quantifizierung wurde der colorimetrische MTT Proliferations-assay verwendet, der auf der Metabolisierung des gelben Tetrazolium-Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) zu einem braunen Formazan-Produkt basiert.

Je nach Proliferationsrate der verwendeten Zelllinie wurden  $10^4$ - $5 \times 10^4$  Zellen in 50 µl pro well in einer 96 well Gewebekulturplatte ausgesät und über Nacht kultiviert oder direkt mit Protein behandelt. Die zu testenden Proteine, die zuvor gegen für die Zellkultur geeignetes PBS dialysiert wurden, wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in Zellkulturmedium in einem Volumen von ebenfalls 50 µl zu den Zellen gegeben und für 20 bis 48 Stunden inkubiert. Alle Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden 10 µl MTT-Lösung je well zu den Zellen gegeben und die Zellen für weitere 2-4 Std. bei 37°C kultiviert. Da das gebildete Formazan-Salz in Wasser unlöslich ist, wurden die Zellen durch Zugabe von 90 µl Lysepuffer je well bei 37°C für 2 Std. oder über Nacht lysiert. Die Farbentwicklung wurde durch Messung der Absorption bei 590 nm quantifiziert und die Überlebensrate aus den Meßwerten relativ zu unbehandelten Zellen berechnet. Die in den Abbildungen dargestellten Meßwerte sind Mittelwerte der Einzelmeßwerte.

#### 2.2.4.5 Nachweis von Apoptose

Die Induktion von Apoptose durch die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine wurde mithilfe der nachfolgend aufgeführten Nachweisverfahren untersucht. Dazu wurden üblicherweise  $10^4$ - $4 \times 10^4$  Zellen/well in einer 96 well Gewebekulturschale ausgesät, über Nacht kultiviert und mit Proteinen in unterschiedlichen Konzentrationen (Gesamt volumen 100 µl) und über unterschiedliche Zeiträume behandelt. Als Positivkontrolle für die Induktion von Apoptose wurde Staurosporin verwendet, ein Inhibitor von Protein Kinasen, insbesondere der Protein Kinase C. Staurosporin wurde in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt und sofern nicht anders angegeben für 16 Std. mit den Zellen inkubiert.

#### *Hoechst-Färbung*

Hoechst 33342: (Sigma); 5 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
 Propidiumjodid: (Sigma); 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O  
 Hoechst Färbelösung: 5 µg/ml Hoechst 33342; 1 µg/ml Propidiumjodid in PBS

Morphologische Veränderungen des Zellkerns wurden durch Färbung der zellulären DNA mit Hoechst 33342 detektiert, einem Fluoreszenzfarbstoff, der intakte Zellmembranen durchdringt, so daß apoptotische wie nicht-apoptotische Zellen angefärbt werden. Eine Fixierung der Zellen ist nicht erforderlich. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, mit dem zuvor abpipettierten Überstand vereinigt, durch Zentrifugation pelletiert, in 20 µl Färbelösung je Ansatz resuspendiert und 10 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und möglichst schnell mikroskopisch analysiert. Dazu wurden ca. 10 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung fotografiert.

#### *Cell death detection ELISA plus (Roche)*

Zum Nachweis von Apoptose in einer größeren Anzahl von Proben wurde der „Cell death detection ELISA plus“ kit der Firma Roche im Wesentlichen nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Dieser

ELISA detektiert Histon-gebundene DNA-Fragmente in zytoplasmatischen Extrakten apoptotischer Zellen. Um evtl. abgelöste Zellen oder Zellfragmente mit zu erfassen, wurde die Gewebekulturplatte zunächst 10 min. bei 200xg zentrifugiert. Von den 100 µl Medium je well wurden 90 µl abpipettiert und verworfen. Durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer je well und Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur wurden die Zellen lysiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min. bei 200xg wurden jeweils 20 µl des Überstands in eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte überführt und 80 µl Enzymlösung, die nach Vorschrift hergestellt wurde, zugegeben. Die Ansätze wurden 2 Stunden inkubiert, dreimal gewaschen und mit Substratlösung versetzt. Sobald eine deutliche Grünfärbung der Positivkontrolle sichtbar war, wurde die Absorption bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech) gemessen.

### ***TUNEL-Reaktion***

Zum Nachweis von DNA-Fragmentierung in apoptotischen Zellen mithilfe der TUNEL-Reaktion (terminal dUTP nick end labelling) wurde der „in situ cell death detection kit, Fluorescein“ der Firma Roche nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Zellen wurden dazu auf adhäsiv Epoxy-beschichteten „8 well“ Diagnostik Objektträgern (Roth) anstelle von 96 well Platten kultiviert und mit Reagenslösungen in einem Volumen von je 50 µl behandelt. Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) fotografiert.

### ***AnnexinV-Färbung***

AnnexinV-FITC Lösung: (Pharmingen)

Annexin V-

Bindungspuffer: 10 mM Hepes; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4

Propidiumjodid: 1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

Um die Externalisierung von Phosphatidylserin, einem charakteristischen Merkmal von Apoptose zu untersuchen, wurden die Zellen mit Trypsin von der Kulturschale entfernt und abzentrifugiert. Jeder Ansatz (ca. 10<sup>5</sup> Zellen) wurde in 100 µl Annexin V-Bindungspuffer resuspendiert, mit 5 µl Annexin V-FITC Färbelösung und 1 µg/ml Propidiumjodid versetzt und 15 min. im Dunkeln inkubiert. 2 µl der Zellsuspension wurden auf einen Objektträger gegeben und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon) analysiert.

### **2.2.4.6 Einschleusen von Granzym B und Caspase-3 in HeLa Zellen mithilfe des BioPORTER Reagens**

BioPORTER (Gene Therapy Systems), gelöst in Chloroform

HBS: 25 mM Hepes; 140 mM NaCl; 0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4

PBS: für die Zellkultur

Das kationische, Lipid-basierende Reagens BioPORTER (Gene Therapy Systems) ist in der Lage, eine Vielzahl von funktionalen Proteinen, Peptiden oder Antikörpern in verschiedene Zelltypen einzuschleusen. Das Einbringen von aktiven Caspasen führt zur Induktion von Apoptose in transduzierten Zellen [Zelphati, 2001], was als Nachweis dafür dient, daß Proteine unter Erhalt ihrer physiologischen Funktion in Zellen transportiert werden.

Transduktionsansätze wurden in 96 well Gewebekulturschalen nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 5x10<sup>3</sup> HeLa Zellen in 96 well Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Das Transduktionsreagens wurde nach Herstellerangaben in Chloroform gelöst und 1 µl je Ansatz in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Gefäße wurden in einer Sterilwerkbank offen für mindestens eine Stunde zum Verdampfen des Lösungsmittels stehen gelassen. Anschließend wurde das BioPORTER Reagens mit jeweils 10 µl Proteinlösung, die die entsprechende Menge an Protein in PBS oder HBS enthielt, durch drei- bis fünfmaliges Auf- und Abpipettieren, Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur und kurzes leichtes Vortexen rehydriert. Die BioPORTER-Protein-Komplexe

wurden mit jeweils 90 µl Serum-freiem Medium versetzt und auf die mit Serum-freiem Medium gewaschenen Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 4 Std. bei 37°C im Brutschrank inkubiert, um die Aufnahme der Komplexe zu gewährleisten. Anschließend wurde fötales Kälberserum zu einer Endkonzentration von 10% zu den Zellen zugegeben und diese über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Induktion von Apoptose wurde mithilfe des „Cell death detection ELISA plus“ kit (Roche) nachgewiesen.

### 3 Ergebnisse

Zytotoxische T-Lymphozyten sowie NK-Zellen stellen einen äußerst wirkungsvollen Abwehrmechanismus des menschlichen Organismus gegenüber Virus-infizierten, körperfremden oder transformierten Zellen dar. Diese für den Organismus schädlichen Zellen werden durch gezielte Induktion von apoptotischem Zelltod eliminiert. Dazu dient der Inhalt von sogenannten zytotoxischen Vesikeln, der nach Kontakt mit einer als schädlich erkannten Zelle sekretiert wird und neben verschiedenen Serin-Proteasen unterschiedlicher Spezifität, die als Granzyme bezeichnet werden, das porenbildende Protein Perforin enthält. Das Zusammenwirken von Granzym B mit Perforin führt zur schnellen Induktion von apoptotischem Zelltod in Zielzellen, der innerhalb weniger Stunden eintritt. Während die Funktion von Perforin darin besteht, Granzym B das Eindringen in die Zelle zu ermöglichen und Zugang zu zellulären Zielproteinen im Zytoplasma oder Zellkern zu gewähren, ist die enzymatische Aktivität von Granzym B direkt für die Aktivierung der Apoptose-Maschinerie verantwortlich.

Als zentrale Effektoren von Apoptose fungiert die Familie der Caspasen, die konstitutiv in allen Körperzellen in Form inaktiver Proenzyme exprimiert werden. Apoptosesignale führen zur proteolytischen Aktivierung von Caspasen, die sich dann in einem Kaskaden-artigen Prozess sowohl gegenseitig prozessieren als auch zelluläre Substrate spalten und dadurch den apoptotischen Phänotyp der Zelle hervorrufen. Die Aktivierung von Caspase-3 spielt dabei eine zentrale Rolle, da sie wahrscheinlich als letztes und ausschlaggebendes Ereignis zur Induktion von apoptotischem Zelltod stattfindet und für die meisten Veränderungen während Apoptose verantwortlich ist.

Granzym B ist das einzige bisher bekannte Enzym, das die Substratspezifität der Caspasen teilt und daher durch Nachahmung von Caspasen-Aktivität an verschiedenen Punkten das apoptotische Zelltodprogramm starten kann. Da die meisten Regulationsmechanismen, die vielfach in Tumoren dereguliert sind, oberhalb von Granzym B in den Apoptose Signalwegen wirken, stellt diese Protease ein vielversprechendes Molekül für den Einsatz in neuen Tumorzell-spezifischen Therapieansätzen dar. Das gezielte Einführen von Granzym B in Tumorzellen könnte dazu dienen, diese selektiv durch Induktion von Apoptose zu eliminieren. Darüber hinaus könnte ein weiterer therapeutisch interessanter Ansatz darin bestehen, aktive Caspase-3 selektiv in Tumorzellen einzuschleusen und so Apoptose am letzten, zentralen Schritt der Signalkaskade zu initiieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden enzymatisch aktives Granzym B sowie enzymatisch aktive Caspase-3 wie unter 3.1 bzw. 3.4 beschrieben als rekombinante Proteine hergestellt. Da zu Beginn der Arbeit nur relativ wenig darüber bekannt war, wie Granzym B Apoptose initiiert noch wie es in Zielzellen eindringt, wurde insbesondere das Verhalten von rekombinantem Granzym B gegenüber Gewebekulturzellen näher untersucht, um Informationen darüber zu erhalten, inwiefern die Protease oder modifizierte Formen als zytotoxische Effektorfunktion in neuen, Tumorzell-spezifischen, therapeutisch wirksamen Fusionsproteinen eingesetzt werden können. Die Ergebnisse hierzu sind unter 3.2 beschrieben. Die Konstruktion von möglichen Granzym B-Fusionsproteinen, die (selektiv) in Tumorzellen aufgenommen werden könnten, ist unter 3.3 dargestellt. Schließlich wurden verschiedene Antikörper-Fusionsproteine, die auf aktiver Caspase-3 als zytotoxischer Effektorfunktion basieren, wie unter 3.4 beschrieben exprimiert und funktionell charakterisiert.

### 3.1 Heterologe Expression von rekombinantem humanem Granzym B und Überprüfung der enzymatischen Aktivität *in vitro*

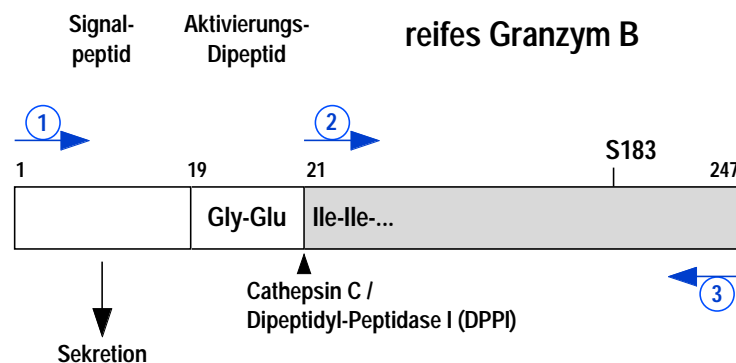
#### 3.1.1 Ausgangssituation

Zu Beginn der Arbeit war die Expression von rekombinantem, enzymatisch aktivem murinen [Caputo, 1993] bzw. humanen Granzym B [Smyth, 1995] nur in Säugerzellen beschrieben worden, während Versuche, rekombinantes Protein in Bakterien, Hefen oder mithilfe des Bakulovirus-Systems herzustellen, nicht erfolgreich waren [Smyth, 1995; Kummer, 1996]. Die so produzierten Mengen rekombinanter Protease waren jedoch relativ gering; enzymatische Aktivität wurde lediglich in Extrakten von Zellkulturen nach transienter Transfektion nachgewiesen. Es war daher zunächst notwendig, ein geeignetes Expressionssystem zur Herstellung von rekombinantem Granzym B im mg-Bereich zu etablieren.

Ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen Granzym B war zunächst ebenfalls nicht verfügbar, so daß rekombinantes Protein nur mithilfe eines Peptid-tags detektiert werden konnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher auch ein polyklonales Granzym B-Antiserum hergestellt, um Granzym B spezifisch immunologisch nachweisen zu können.

Zur Detektion der enzymatischen Aktivität wurde ein Peptidsubstrat in der Literatur beschrieben [Caputo, 1993; Shi, 2000]; eine Positivkontrolle in Form von kommerziell erhältlichem, aktivem Granzym B stand jedoch ebenfalls nicht zur Verfügung.

#### 3.1.2 Untereinheitenstruktur von Granzym B



**Abb. 3.1 Untereinheitenstruktur von Granzym B.** Granzym B wird als Prä-Proenzym synthetisiert, das aus einem Signalpeptid für die Verpackung in sekretorische Vesikel und einem Aktivierungs-dipeptid besteht, das durch Cathepsin C abgespalten werden muß, um enzymatisch aktives, reifes Granzym B zu produzieren. Blau eingezeichnet sind die für die Klonierung der vollständigen cDNA verwendeten PCR primer 1 und 3. Zur Ableitung von Konstrukten, die enzymatisch aktives Granzym B kodieren, wurden primer 2 und 3 verwendet.

Granzym B wird in T-Lymphozyten als enzymatisch inaktives Prä-Proenzym synthetisiert. Dieses besteht, wie in Abb. 3.1 dargestellt, aus einem Signalpeptid, einem Aktivierungs-Dipeptid (Gly-Glu), sowie der Sequenz der reifen Protease. Das Signalpeptid markiert das Enzym für die Verpackung in Membran-umhüllte Vesikel, in denen es bis zur Sekretion nach



Kontakt der T-Zelle mit einer Zielzelle gespeichert vorliegt. Das Aktivierungs-Dipeptid muß zum Erwerb der enzymatischen Aktivität abgespalten werden. Dies geschieht während der Verpackung in zytotoxische Vesikel durch Cathepsin C / Dipeptidyl-Peptidase I (DPPI), die konstitutiv in lysosomalen Kompartimenten exprimiert wird.

Die Deletion des Aktivierungs-Dipeptids führt nach transienter Transfektion von COS-Zellen mit diesem mutierten Konstrukt zur Produktion von enzymatisch aktivem murinen [Caputo, 1993] bzw. humanen [Smyth, 1995] Granzym B. Die Notwendigkeit der Abspaltung der beiden Aminosäuren deutet darauf hin, daß für die enzymatische Aktivität ein freier, definierter N-Terminus erforderlich ist, d.h. daß zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen.

Um enzymatisch aktives Granzym B rekombinant herzustellen, wurden Expressionsplasmide daher so konstruiert, daß nach Möglichkeit keine zusätzlichen Aminosäuren (etwa durch Polylinkersequenzen) an den N-Terminus der reifen Protease angefügt werden oder zusätzliche Peptidsequenzen nachträglich proteolytisch abgespalten werden können.

### 3.1.3 Klonierung der cDNA von humanem Granzym B

Als Basis für alle in dieser Arbeit beschriebenen Granzym B-Konstrukte diente die vollständige cDNA von humanem Granzym B, die aus peripheren mononukleären humanen Blutzellen (PBMC) kloniert wurde.

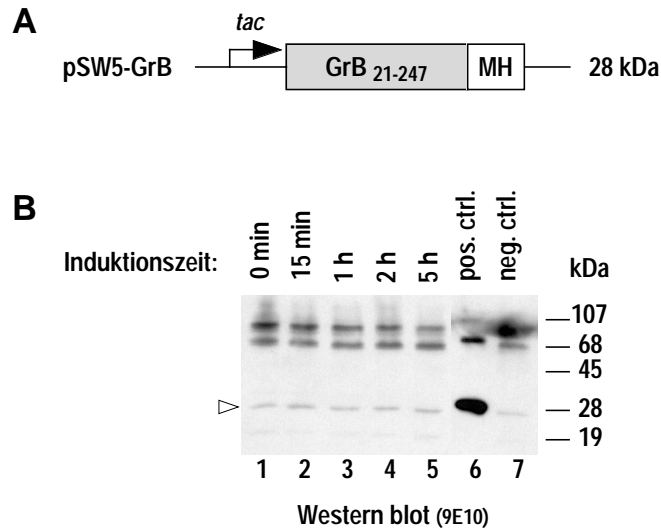
PBMCs wurden aus humanem Vollblut wie unter 2.2.1.3 beschrieben isoliert. Aus den Lymphozyten wurde anschließend GesamtRNA präpariert, die zur Synthese von cDNA eingesetzt wurde (2.2.1.3). Mit den Granzym B-spezifischen PCR primern „5' XhoI GrB“ und „3' SacI GrB“ (Sequenz siehe 2.1.5), die den Oligonukleotiden 1 und 3 in Abb. 3.1 entsprechen, wurde die vollständige cDNA von humanem Granzym B bei einer Hybridisierungstemperatur von 48°C amplifiziert (2.2.1.4) und über die XhoI und SacI Schnittstellen in pBIIKS inseriert. Die so erhaltene DNA-Sequenz wurde durch Vergleich mit der in der Genbank unter der accession no. J04071 [Trapani, 1988] gespeicherten Sequenz verifiziert.

In Abweichung von der ursprünglich veröffentlichten Sequenz kodiert die in dieser Arbeit verwendete Sequenz, die übereinstimmend aus dem Blut von zwei unterschiedlichen Spendern gewonnen wurde, anstelle eines Glycins ein Valin an Position 72 des Prä-Proenzym. Spätere Genbank-Einträge (accession no. NM\_004131) der cDNA-Sequenz von Granzym B oder von ESTs bestätigen jedoch überwiegend das Vorliegen eines Valins an Position 72; evtl. liegt hier ein Polymorphismus vor.

### 3.1.4 Expression von Granzym B in *E. coli*

Zunächst wurde untersucht, ob enzymatisch aktives Granzym B heterolog in *E. coli* exprimiert werden kann. Die für das reife Enzym kodierende cDNA (entsprechend Aminosäuren 21 bis 247; vgl. Abb. 3.1) wurde dazu in den *E. coli* Expressionsvektor pSW50mh [Gerstmayer, 1997a] zwischen die NdeI und XbaI sites inseriert. In dem resultierenden Plasmid pSW5[GrB] steht die cDNA Sequenz von Granzym B unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. Die Proteintranslation startet bei dem in der NdeI site enthaltenen ATG, so daß am N-Terminus des rekombinanten Proteins ein zusätzliches Methionin, sonst jedoch keine weiteren Aminosäuren zusätzlich zur Sequenz von reifem Granzym B vorhanden sind. An den C-Terminus von Granzym B wurden die vektorkodierten

Sequenzen für ein Myc-Epitop sowie einen Hexahistidin-tag angefügt, die zur Detektion des rekombinanten Proteins dienen bzw. die Reinigung über Metall-Affinitätschromatographie erlauben (Abb. 3.2 A).



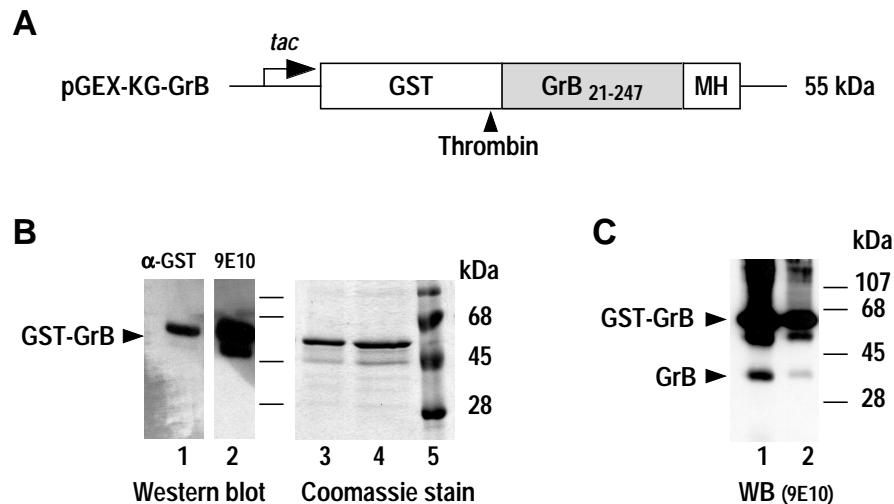
**Abb. 3.2 A, Expressionsplasmid für die Herstellung von reifem Granzym B in *E. coli*.** Der Vektor wurde wie im Text beschrieben konstruiert. Das rekombinante Protein enthält ein C-terminales Myc-Epitop sowie einen Hexahistidin-tag (MH) **B, Western blot von Lysaten einer Expressionskultur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der Proteinexpression.** Es wurden jeweils Volumina, die der gleichen optischen Dichte der Kultur wie zum Zeitpunkt 0 entsprachen, aufgetragen. Der blot wurde mit monoklonalem anti-Myc Antikörper 9E10 entwickelt. Negativkontrolle: Totallysat einer vergleichbaren Kultur, die kein Protein mit Myc-tag exprimiert. Positivkontrolle: 100 ng GST-Myc-his (27 kDa).

*E. coli* XL1 blue wurden mit diesem Konstrukt transformiert und Expressionskulturen wie unter 2.2.3.1 beschrieben auf die Produktion von Granzym B analysiert. Die theoretische molare Masse des rekombinanten Proteins beträgt 28 kDa. Zum immunologischen Nachweis von rekombinantem Granzym B wurde der monoklonale anti-Myc Antikörper 9E10 verwendet. Während das als Positivkontrolle aufgetragene GST-myc-his Protein auf dem in Abbildung 3.2 B gezeigten Western blot eindeutig detektiert werden konnte, konnte selbst 5 Std. nach Induktion keine für Granzym B spezifische Proteinbande in Lysaten der Expressionskultur nachgewiesen werden (vgl. Spur 7 mit Spuren 2-5). Ein entsprechendes negatives Ergebnis wurde in *E. coli* CC118 erzielt (nicht gezeigt). Mit einem monoklonalen Granzym B-spezifischen Antikörper (Santa Cruz) konnte später ebenfalls keine Expression von Granzym B in diesem System detektiert werden (nicht gezeigt).

### **Expression von Granzym B als GST-Fusionsprotein**

Da wie zuvor beschrieben reifes Granzym B in *E. coli* nicht exprimiert werden konnte, wurde ein GST-Fusionsprotein konstruiert (Abb 3.3 A). Dazu wurde die cDNA von reifem Granzym B mit Myc- und Hexahistidin-tag, die als NdeI, XhoI-Fragment aus pSW5[GrB] gewonnen wurde, zwischen die BamHI und XhoI sites von pGEX-KG [Guan, 1991] inseriert, nachdem die überhängenden DNA-Enden der NdeI und BamHI sites durch eine „fill-in“

Reaktion aufgefüllt worden waren. pGEX-KG basiert auf pGEX-4T2 und enthält im Polylinkerbereich ein DNA-Oligonukleotid, das einen Glycin-Serin-Linker kodiert. Der resultierende Expressionsvektor pGEX-KG[GrB] kodiert für GST-GrB mit einer theoretischen molaren Masse von 55 kDa. Zur Abspaltung des GST-Anteils enthält das Konstrukt eine Thrombin-Spaltstelle, es entsteht jedoch nach Prozessierung ein modifiziertes Granzym B, das am N-Terminus ein Tripeptid Gly-Ser-Met vor der Sequenz von reifem Granzym B enthält.



**Abb. 3.3 Expression von Granzym B als GST-Fusionsprotein in *E. coli*.** **A, Expressionsplasmid für die Produktion von GST-GrB** mit C-terminalem Myc- und Hexahistidin-tag (MH). Der Vektor pGEX-KG basiert auf dem kommerziellen pGEX-4T2 mit Glycin-Serin-Linker und erweiterter multiple cloning site. **B, Western blot und Coomassie gefärbtes SDS-Gel von gereinigtem GST-GrB.** Das Protein wurde in 8 M Harnstoff denaturiert, über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt und wie im Text beschrieben renaturiert. Spuren 1,2,3: 4  $\mu\text{g}$ , Spur 4: 8  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein, Spur 5: Markerproteine. **C, Western blot von GST-GrB nach Thrombinspaltung.** GST-GrB wurde über Nacht mit Thrombin inkubiert und abgespaltenes GST durch Reinigung über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie abgetrennt. Spur 1: Eluatfraktion 1, Spur 2: Eluatfraktion 2.

Mit pGEX-KG[GrB] transformierte *E. coli* XL1 blue Kulturen exprimieren ein Protein von ca. 50 kDa, das sich im Western blot spezifisch mit anti-GST und anti-Myc 9E10 Antikörpern nachweisen läßt (Abb. 3.3 B). Dieses Protein konnte jedoch nicht in nativer Form über Glutathion-Agarose gereinigt werden, da es vollständig unlöslich in Form von „inclusion bodies“ vorlag.

Daher wurde das rekombinante Protein aus Bakterienpellets von Expressionskulturen durch Denaturierung in 8 M Harnstoff solubilisiert und wie unter 2.2.3.6 beschrieben über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt.

Das denaturierte gereinigte Protein mußte dann zur weiteren Verwendung renaturiert werden. Dazu wurden zwei unterschiedliche Rückfaltungsprotokolle verwendet. Da der berechnete isoelektrische Punkt pI von GST-GrB 8,6 beträgt, d.h. das Protein bei Rückfaltung im pH-Bereich von 7,5 bis 8,0 theoretisch eine sehr hohe Tendenz zum Ausfallen hat, wurde die Renaturierung zunächst bei pH 6,5 durchgeführt: Das Eluat der  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie wurde bei 4°C gegen PBS mit pH 6,5 dialysiert, dem zusätzlich 400 mM L-Arginin

zugesetzt waren, um ein Ausfallen des Proteins zu verhindern (2.2.3.7, [Buchner, 1991]). In einem zweiten Schritt wurde gegen den gleichen Puffer bei pH 7,1 dialysiert und schließlich zur proteinhaltigen Lösung 10% Glycerin zugegeben. Die Verringerung der Arginin-Konzentration durch erneute Dialyse führte zur Bildung von Proteinaggregaten und dem Ausfallen des Proteins, so daß darauf verzichtet und das GST-GrB für weitere Experimente in Arginin-haltigem PBS eingesetzt wurde. Alternativ wurde das gereinigte GST-GrB unter stark reduzierenden Bedingungen zurückgefaltet. Dazu wurde die Eluatfraktion der  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitäts-chromatographie zunächst gegen PBS, 400 mM L-Arginin pH 7,4 mit 10% Glycerin und 20 mM DTT dialysiert und die DTT-Konzentration durch Dialyse schrittweise auf 2 mM verringert. In beiden Fällen betrug die Ausbeute an zurückgefaltetem Protein ca. 1 bis 2 mg je Liter Expressionskultur.

Beide Proteinpräparationen wurden zur Abspaltung des GST-Anteils nach 2.2.3.9 mit Thrombin über Nacht behandelt und anschließend nochmals über  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose unter nativen Bedingungen gereinigt, um abgespaltenes GST abzutrennen. Während dieses nicht an  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose bindet, konnte das freigesetzte Granzym B über den C-terminalen His-tag immobilisiert und mit Imidazol eluiert werden. Die Analyse der Spaltansätze über SDS-PAGE und Western blot zeigte jedoch, daß der GST-Anteil nur unvollständig abgespalten wurde und der überwiegende Teil des Proteins nach wie vor als GST-GrB vorlag (Abb. 3.3 C), das wie freies Granzym B über den His-tag an  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose bindet. Das ungespaltene Fusionsprotein konnte daher von prozessiertem Granzym B nicht abgetrennt werden. Auf weitere Aufreinigungsschritte wurde jedoch verzichtet, da zunächst untersucht wurde, ob die so hergestellte Protease enzymatische Aktivität besitzt, d.h. ob in der Proteinfraction nach partieller Abspaltung von GST Granzym B-Aktivität nachgewiesen werden kann.

### **3.1.5 Etablierung eines *in vitro* Nachweissystems der enzymatischen Aktivität von Granzym B: Spaltung von Procaspase-3 als natürlichem Substrat für Granzym B**

Vor Beginn dieser Arbeit wurde in der Literatur ein Zwei-Komponenten-System zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B *in vitro* beschrieben [Caputo, 1993; Trapani, 1993]. Dieses System beruht auf der Spaltung des Peptidsubstrats Boc-Ala-Ala-Asp-SBzl (Boc: tert-Butyloxycarbonyl-; SBzl: Thio-Benzyl-) durch Granzym B. Die Hydrolyse der Aspart-Thio-Benzyl-Esterbindung führt zur Freisetzung von Thiobenzylalkohol, der mit der als Indikator zugesetzten 2,2'-Dinitro-5,5'-dithio-dibenzoessäure (DTNB; Ellmans Reagens) unter Bildung des gelben 3-Carboxy-4-nitrophenoxid Ions reagiert. Die Farbentwicklung in der Lösung als Maß der enzymatischen Aktivität kann spektrometrisch gemessen werden. Da DTNB durch freie SH-Gruppen oder andere Reduktionsmittel generell reduziert wird, besteht das Problem dieses Nachweissystems in der relativ hohen Hintergrund„aktivität“, die bei Vorhandensein reduzierender Substanzen in den Proteinpräparationen gemessen wird.

Proteinfractionen, die Granzym B enthielten, das wie unter 3.1.4 dargestellt als GST-GrB gereinigt, zurückgefaltet und mit Thrombin gespalten worden war, wurden zum Nachweis von Aspartase-Aktivität mit Boc-Ala-Ala-Asp-SBzl als Substrat wie in der Literatur beschrieben [Caputo, 1993] inkubiert. Unabhängig von der Menge eingesetzten Proteins konnte jedoch keine spezifische Gelbfärbung der Lösung beobachtet werden. Eine Positivkontrolle in Form von

gereinigtem oder rekombinantem enzymatisch aktiven Granzym B stand zunächst jedoch nicht zur Verfügung, so daß das negative Ergebnis dieses Tests nur schwer zu interpretieren war. Um zu überprüfen, ob die verwendeten Chemikalien prinzipiell zum Nachweis von Granzym B-Aktivität geeignet sind, wurde daher Gesamtzellextrakt der murinen T-Zelllinie Cl96 [Moritz, 1994] hergestellt und in diesem Aktivitätstest als Enzymkomponente eingesetzt. Allerdings führte der Zellextrakt bei Inkubation mit dem Indikator DTNB in Abwesenheit von Substrat bereits zur Gelbfärbung der Lösung, was auf das Vorhandensein reduzierender Substanzen im Extrakt zurückzuführen ist. Eine darüber hinausgehende spezifische Färbung, die durch enzymatische Spaltung des Peptidsubstrats hervorgerufen wird, konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

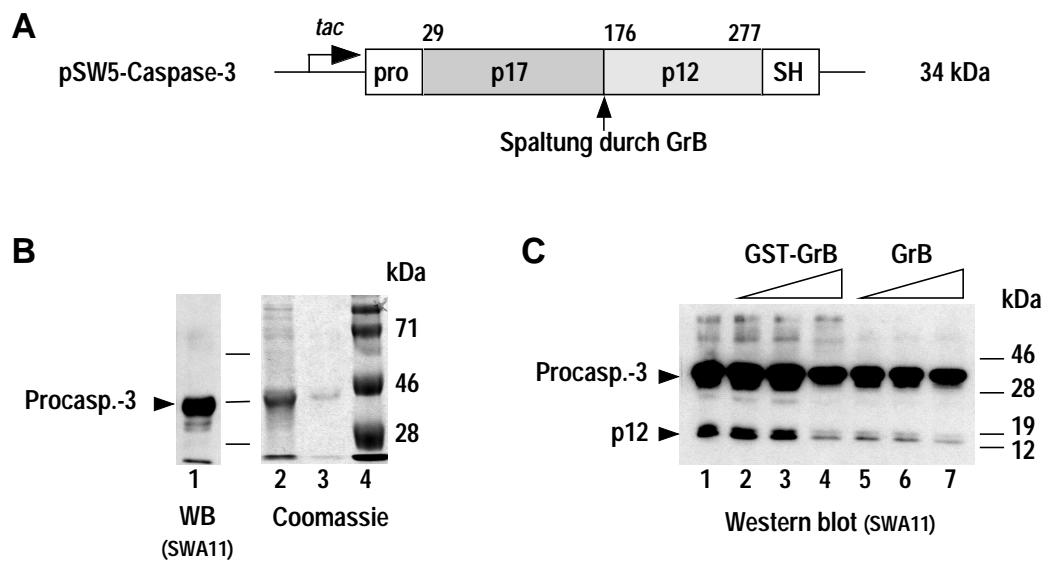
Um die enzymatische Aktivität von Granzym B in einem direkten System nachweisen zu können, wurde daher ein eigenes Testsystem entwickelt, in dem rekombinante Procaspase-3 als Substrat für Granzym B fungiert. Dazu wurde die vollständige cDNA von humaner Caspase-3 aus der cDNA von peripheren mononukleären Blutzellen (2.2.1.3) über PCR mit den Caspase-3-spezifischen primern „5' BamHI, NdeI Casp3“ und „3' SacI, XbaI Casp3“ bei einer Hybridisierungstemperatur von 48°C amplifiziert. Das PCR Produkt wurde zwischen die BamHI und SacI sites von pBIKS inseriert und die Sequenz durch Vergleich mit der in der Genbank gespeicherten (accession no. U13738) verifiziert.

### ***Expression von Procaspase-3 in E. coli***

Die cDNA von Procaspase-3 wurde aus dem Plasmid pBIKS[Caspase-3] als NdeI, XbaI-Fragment gewonnen und zwischen die entsprechenden sites von pSW50sh ligiert. Im resultierenden Expressionsvektor pSW5[Caspase-3] steht die cDNA von Procaspase-3 unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promotors. An den C-Terminus des rekombinanten Proteins wurden die Sequenzen kodierend für ein SWA11-Epitop sowie einen Hexahistidintag angefügt (Abb. 3.4 A).

Dieses Konstrukt wurde in *E. coli* XL1 blue überexprimiert (2.2.3.1) und das rekombinante Protein denaturierend über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.6). Abbildung 3.4 B zeigt ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel (Spur 2, 3) sowie einen Western blot (Spur 1) der Eluatfraktionen. Procaspase-3 ist als prominente Bande von ca. 40 kDa zu sehen. Spätere Veröffentlichungen beschreiben die autokatalytische Prozessierung von Procaspase-3 in *E. coli* Expressionskulturen bei Induktionszeiten über einer Stunde [Mittl, 1997; Roy, 2001]. Als Ursache wurde die Absenkung des pH-Wertes im Medium identifiziert, die zur Selbstaktivierung des Enzyms führt. Das in dieser Arbeit verwendete Proenzym wurde durch Induktion der Proteinexpression für eine Stunde bei 37°C hergestellt und liegt, im Gegensatz zu Protein aus Kulturen, die 90 min. oder länger induziert wurden (vgl. 3.4.1), weitgehend unprozessiert vor.

Für den Einsatz als Granzym B-Substrat wurde die denaturierend gereinigte Procaspase-3 zurückgefaltet. Dazu wurde das Eluat der  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose gegen PBS mit 20 mM DTT und 10% Glycerin dialysiert und die DTT-Konzentration anschließend durch Dialyse auf 2 mM erniedrigt. Aus einem Liter Expressionskultur konnten so ca. 2 mg Protein isoliert werden.



**Abb. 3.4 Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 durch Granzym B.** **A, Konstrukt zur Herstellung von Procaspase-3 in *E. coli*.** Das rekombinante Protein enthält am C-Terminus ein SWA11-Epitop (S) zur Detektion im Western blot und einen Hexahistidin-tag (H) zur Reinigung über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie. **B, Western blot und Coomassie gefärbtes SDS-Gel von denaturierend gereinigter und rückgefalteter Procaspase-3.** Spur 1,2: Eluatfraktion 1, Spur 3: Eluatfraktion 2, Spur 3: Markerproteine. **C, Analyse der Spaltung von Procaspase-3 durch rekombinantes Granzym B.** Die Ansätze 1-7 enthielten je 600 ng Procaspase-3 entspr. 400 nM. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur mit 1, 10 und 100 mM GST-GrB (Spuren 2-4), das unter stark reduzierenden Bedingungen zurückgefaltet wurde, bzw. 0,5, 5 und 50 mM Granzym B (Spuren 5-7), das nach partieller Thrombinspaltung und Abtrennung von GST gewonnen wurde, inkubiert. Die Spaltansätze wurden über SDS-PAGE und Western blot, der mit SWA11 Antikörper entwickelt wurde, auf das Auftreten des p12 Caspase-3 Fragments analysiert.

#### ***In vitro* Spaltung von Procaspase-3 zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B**

Um zu untersuchen, ob das in *E. coli* als GST-Fusionsprotein hergestellte Granzym B nach oder evtl. sogar ohne Abspaltung von GST enzymatische Aktivität besitzt und Procaspase-3 *in vitro* spaltet, wurden beide Proteine wie unter 2.2.3.12 beschrieben über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Spaltansätze wurden anschließend durch SDS-PAGE und Western blot analysiert. Der Western blot wurde mit dem SWA11 Antikörper, der an den Epitop-tag am C-Terminus der rekombinanten Procaspase-3 bindet, entwickelt. Nach Proteolyse durch Granzym B wird daher als Spaltprodukt die p12 Untereinheit detektiert (vgl. Abb. 3.4 A).

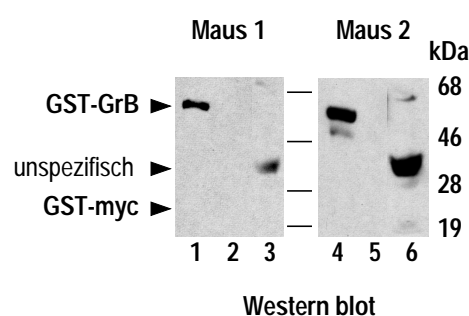
In dem in Abbildung 3.4 C gezeigten Experiment wurden je Ansatz 600 ng Procaspase-3 (entspr. 400 nM) mit 1, 10 und 100 nM GST-GrB oder 0,5, 5 und 50 nM GrB behandelt, das unter reduzierenden Bedingungen wie oben beschrieben zurückgefaltet wurde. Als Granzym B wurde die in Abb. 3.3 C gezeigte Eluatfraktion der  $\text{Ni}^{2+}$ -Sephrose nach Thrombinspaltung des Fusionsproteins eingesetzt, die neben freiem Granzym B noch relativ viel ungespaltenes GST-GrB enthielt. Die Inkubation von Caspase-3 mit GST-GrB oder Granzym B führte jedoch nicht zur Abspaltung der p12 Caspase-3 Untereinheit. Das p12 Spaltprodukt, das im Western blot detektiert wurde, ist auch in Ansätzen, die kein Granzym B enthielten, vorhanden und daher auf Autokatalyse von Caspase-3 zurückzuführen (Spur 1). Die Menge an p12 nimmt jedoch nach Behandlung mit GST-GrB oder Granzym B nicht zu.

Die abnehmende Intensität der p12-Bande korreliert mit der der Bande von Procaspase-3 und ist daher wahrscheinlich durch eine geringere Mengen an eingesetztem Protein zu erklären. Eine spezifische Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 durch die untersuchten Granzym B-Präparationen aus *E. coli* konnte damit nicht nachgewiesen werden.

### 3.1.6 Immunisierung von Mäusen zur Gewinnung von polyklonalem anti-Granzym B Antiserum

Ein Problem bei der Etablierung eines Expressionssystems für Granzym B bestand darin, daß zum spezifischen immunologischen Nachweis des rekombinanten Proteins zunächst kein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen Granzym B verfügbar war. Die verwendeten Expressionskonstrukte enthielten daher ein Myc-Epitop zur Detektion des rekombinanten Proteins mit dem monoklonalen anti-Myc Antikörper 9E10. Erfahrungen mit solchen Konstrukten zeigen jedoch, daß in *E. coli* Expressionskulturen der Myc-tag z. T. abgespalten wird, so daß eine Detektion des Proteins nicht mehr möglich ist. Zum immunologischen Nachweis sowie zur spezifischen Reinigung von Granzym B aus T-Zellextrakten wurde in der Literatur ein monoklonaler anti-Granzym B Antikörper beschrieben [Trapani, 1993], der jedoch für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung stand.

Das in *E. coli* exprimierte GST-GrB wurde daher wie unter 2.2.3.4 beschrieben zum Immunisieren von Mäusen zur Gewinnung von anti-Granzym B Antiserum verwendet. Drei Balb/c Mäuse wurden intraperitoneal mit GST-GrB behandelt, das denaturierend über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend durch Dialyse gegen PBS mit 400 mM L-Arginin und 10% Glycerin renaturiert wurde. Den Tieren wurde fünfmal je 20 µg GST-GrB in 100 µl injiziert. Das Serum der Mäuse wurde anschließend auf die spezifische Bindung an Granzym B oder GST sowie die unspezifische Bindung an *E. coli* Proteine im Western blot untersucht.



**Abb. 3.5 Funktioneller Test des in Mäusen hergestellten anti-Granzym B Antiserums.** Der Western blot zeigt GST-GrB (4 µg, Spur 1,4), GST (100 ng, Spur 2,5) und Totallysat einer irrelevanten *E. coli* Expressionskultur (Spur 3,6). Das Granzym B-Antiserum wurde 1:500 verdünnt eingesetzt.

Abbildung 3.5 zeigt die Western blots, die mit dem Serum von zwei der drei Mäuse entwickelt wurden. Aufgetragen wurden 4 µg GST-GrB, das zum Immunisieren verwendet wurde (Spur 1, 4), 100 ng GST (Spur 2, 5) bzw. 10 µl Totallysat einer irrelevanten *E. coli*

Expressionskultur (Spur 3, 6). Während GST-GrB in beiden Fällen als deutliche Bande detektiert werden konnte, wurde GST nicht erkannt, obwohl die Tiere mit dem GST-Fusionsprotein immunisiert wurden, d.h. eine Immunreaktion auch gegen den GST-Anteil des Proteins zu erwarten war. Auch in einer Wiederholung des Experiments wurde GST jedoch nicht durch das Mäuse-Serum detektiert. Vor allem das Serum von Maus 2, aber auch das von Maus 1 bindet ein ca. 35 kDa Protein in irrelevantem *E. coli* Totallysat, das jedoch durch Reinigung von GST-GrB oder GST aus *E. coli* Expressionskulturen abgetrennt wurde.

### 3.1.7 Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.6

Während ein Konstrukt zur Expression von reifem Granzym B in *E. coli* nicht zur Produktion detektierbarer Mengen rekombinanter Protease führte, konnte Granzym B als GST-Fusionsprotein in *E. coli* rekombinant hergestellt werden. Das Protein lag jedoch unlöslich in Form von „inclusion bodies“ vor und mußte daher unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend renaturiert werden. Der GST-Anteil konnte partiell mit Thrombin abgespalten werden, es konnte jedoch keine enzymatische Aktivität von Granzym B nach Abspaltung von GST nachgewiesen werden. Da ein in der Literatur beschriebener colorimetrischer Aktivitätstest keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurde zur Etablierung eines eigenen Nachweissystems für Granzym B-Aktivität Procaspase-3 in *E. coli* exprimiert und als Substrat für Granzym B in Spaltreaktionen eingesetzt. Das unter verschiedenen Bedingungen zurückgefaltete GST-GrB war jedoch auch nach Abspaltung von GST nicht in der Lage, rekombinante Procaspase-3 zu spalten. Nach Hinweisen in der Literatur konnten auch andere Arbeitsgruppen kein rekombinantes Granzym B in *E. coli* herstellen [Kummer, 1993; Smyth, 1995; Kummer, 1996]; daher wurde wie im Folgenden beschrieben die Hefe *Pichia pastoris* als alternatives Expressionssystem verwendet. Das in *E. coli* hergestellte, enzymatisch inaktive GST-Fusionsprotein konnte jedoch erfolgreich zur Gewinnung von polyklonalem anti-Granzym B Antiserum in Mäusen eingesetzt werden, das in den folgenden Experimenten zum spezifischen immunologischen Nachweis von rekombinantem Granzym B diente.

### 3.1.8 Expression von Granzym B in der Hefe *Pichia pastoris*

Als eukaryoter Organismus besitzt die Hefe *Pichia pastoris* viele Vorteile anderer eukaryotischer Expressionssysteme wie die Fähigkeit zur Prozessierung, Faltung und post-translationalen Modifizierung (z. B. Glykosylierung) von Proteinen. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten können in Hefen jedoch relativ große Mengen rekombinanter Proteine exprimiert werden (Übersicht: [Cregg, 2000; Cereghino, 2000]). *Pichia pastoris* ist ein methylotropher Organismus, der in der Lage ist, Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Die Metabolisierung von Methanol erfolgt durch zwei Alkohol-Oxidasen (AOX), wobei Alkohol-Oxidase-1 (AOX1) für den Hauptteil der katalytischen Aktivität verantwortlich ist. Das *AOX1* Gen wird streng reguliert und durch Methanol sehr stark induziert; typischerweise stellt AOX1 über 30% der gesamten löslichen Proteine in *Pichia pastoris* dar, wenn Methanol als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Der *AOX1*-Promotor wird daher verwendet, um heterologe Proteine induzierbar zu exprimieren. Während der Promotor in Anwesenheit von Glukose vollständig reprimiert ist, kann durch Zugabe von Methanol die Expression des rekombinanten Proteins

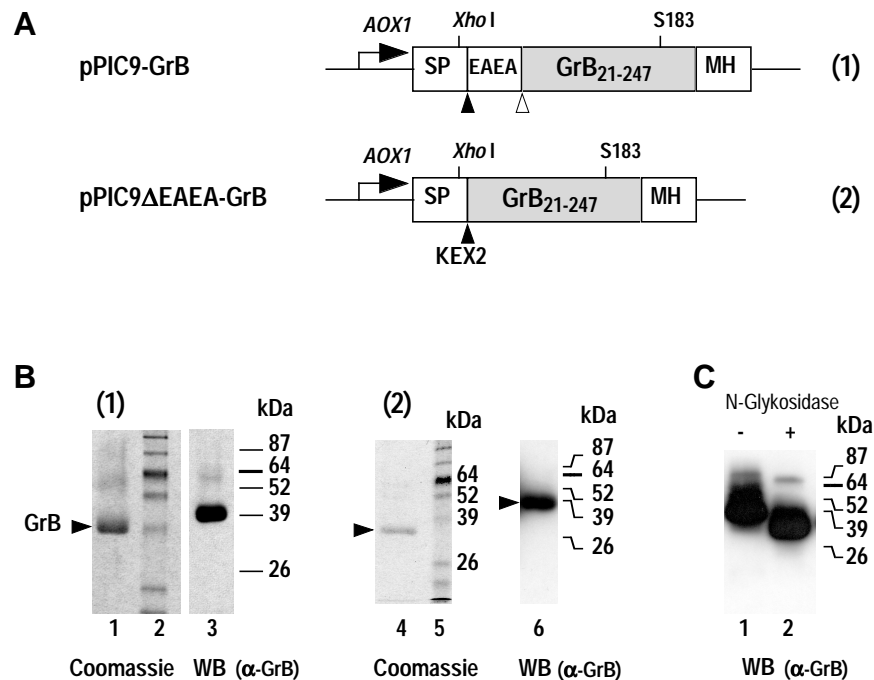


induziert werden. Ein weiterer Vorteil von *P. pastoris* als Expressionssystem besteht darin, daß heterologe Proteine durch Anfügen des  $\alpha$ -Faktor Signalpeptids aus *Saccharomyces cerevisiae* sekretiert werden können. Da *P. pastoris* sehr wenige eigene Proteine sekretiert, stellt das rekombinante Protein den Hauptanteil an Protein im Kulturmedium dar. Glykosylierungs-Sequenzen werden darüber hinaus glykosyliert, im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* findet jedoch keine Hyperglykosylierung statt und das Glykosylierungsmuster ähnelt eher dem höherer Eukaryoten. Im Vergleich zu solchen aus *S. cerevisiae* wirken glykosylierte Proteine aus *P. pastoris* daher nicht hyper-antigen im menschlichen Organismus, was für eine mögliche therapeutische Verwendung von Bedeutung ist [Romanos, 1992].

Zur Expression von rekombinantem Granzym B in *Pichia pastoris* wurde das *Pichia* Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet. Die cDNA von reifem Granzym B wurde dazu in den Vektor pPIC9 inseriert, der die Sekretion heterologer Proteine in das Kulturmedium erlaubt. Das Signalpeptid, das für die Sekretion des überexprimierten Proteins verantwortlich ist, wird während der Ausschleusung in zwei Schritten abgespalten. Der erste Prozessierungsschritt erfolgt durch die *Pichia* Protease KEX2, die zur Furin-Familie gehört, in der Sequenz Glu-Lys-Arg\*Glu-Ala-Glu-Ala, wobei \* die gespaltene Bindung repräsentiert. Das Tetrapeptid Glu-Ala-Glu-Ala wird anschließend durch eine weitere *Pichia* Protease STE13 entfernt. STE13 spaltet jedoch in einigen Fällen nur unzuverlässig, so daß das Glu-Ala-Glu-Ala Tetrapeptid am N-Terminus des rekombinanten Proteins verbleibt. Die Glu-Ala-Glu-Ala Sequenz ist aber offenbar nicht unbedingt für die erste Spaltung durch KEX2 erforderlich, und verschiedene Aminosäuren werden von KEX2 in Position P1' toleriert (Invitrogen *Pichia* Expression Kit Manual).

Zur Produktion von enzymatisch aktivem Granzym B in *Pichia pastoris* wurden daher zwei Konstrukte hergestellt, die in Abbildung 3.6 A schematisch dargestellt sind. Während Konstrukt (1) das vollständige vektorkodierte Signalpeptid enthält, wurde in Konstrukt (2) die cDNA von reifem Granzym B so in den Vektor pPIC9 eingefügt, daß nach Spaltung des resultierenden Proteins durch KEX2 direkt reifes Granzym B entsteht, das am N-Terminus keine zusätzlichen Aminosäuren aufweist. Dazu wurde die cDNA von reifem Granzym B mit den entsprechenden Signalpeptid-Sequenzen mit den PCR primern „5' XhoI GrB“ bzw. „5' XhoI  $\Delta$ EAEAGrB“ und „3' NheI GrB“ an pBIKS[GrB] bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C amplifiziert, zunächst zwischen die XhoI und XbaI sites von pBIKSmh inseriert und als XhoI, NotI-Fragment in die entsprechenden sites von pPIC9 subkloniert. Die beiden resultierenden Konstrukte pPIC9[GrBmh] und pPIC9 $\Delta$ [GrBmh], in denen an den C-Terminus von Granzym B ein Myc-Epitop und Hexahistidin-tag angefügt wird, wurden in *P. pastoris* GS115 transformiert (2.2.1.7). *Pichia* Klone, die die cDNA von Granzym B durch homologe Rekombination stabil in das Hefegenom integriert hatten, wurden durch PCR- und Expressions-Analyse (2.2.3.3) identifiziert (nicht gezeigt).

Wie unter 2.2.3.3 beschrieben, wurden aus positiven Klonen Expressionskulturen zur präparativen Isolierung von Granzym B herangezogen. Aus den Überständen dieser Kulturen wurde das rekombinante Protein über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.6; Abb. 3.6 B) und nachfolgend auf enzymatische Aktivität untersucht. Es konnten ca. 1 bis 2 mg Protein je Liter Expressionskultur isoliert werden. Wie in COS-Zellen exprimierte Granzym B [Caputo, 1993] ist auch das in *Pichia* produzierte Protein glykosyliert (Abb. 3.6 C) und besitzt eine molare Masse von ca. 40 kDa im Vergleich zu der berechneten molaren Masse von 27 kDa für nicht-glykosyliertes Granzym B.

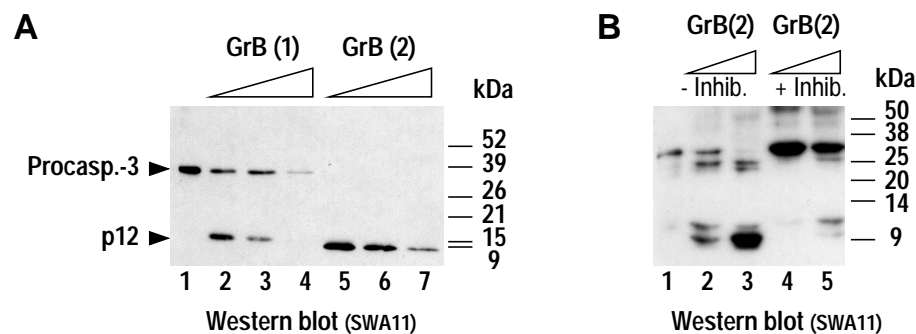


**Abb. 3.6 Expression von humanem Granzym B in der Hefe *Pichia pastoris*.** **A, Konstrukte für die sekretierte Expression von Granzym B.** Die Plasmide wurden wie im Text beschrieben konstruiert. Die cDNA von reifem Granzym B steht unter der Kontrolle des Methanol-induzierbaren *AOX1*-Promotors, das Signalpeptid (SP) des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* erlaubt die Sekretion des rekombinanten Proteins in das Kulturmedium. Während des Transports wird das Signalpeptid durch die *Pichia* Proteasen KEX2 (ausgefüllter Pfeil) und STE13 (leerer Pfeil) abgespalten. Zur Detektion und Reinigung über Metall-Affinitätschromatographie wurde an den C-Terminus von Granzym B ein Myc-Epitop und ein Hexahistidin-tag (MH) angefügt. **B, gereinigte Proteine aus Konstrukt (1) bzw. (2).** Gezeigt sind Coomassie gefärbte SDS-Gele und Western blots von Granzym B, das über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie aus Überständen von *Pichia* Expressionskulturen gereinigt wurde. Die Western blots wurde mit anti-Granzym B Serum von Maus 2 (3.1.6) in einer Verdünnung von 1:500 entwickelt. Spuren 1,3,4,6: je 40  $\mu\text{l}$  Eluatfraktion entsprechend 4  $\mu\text{g}$  (Konstrukt 1) bzw. 800 ng (Konstrukt 2) Granzym B; Spuren 2,5: Markerproteine. **C, Das in *Pichia pastoris* exprimierte Granzym B ist glykosyliert.** Gereinigtes Granzym B (Konstrukt 1) wurde mit N-Glykosidase behandelt (Spur 2). Die molare Masse des deglykosylierten Proteins beträgt etwa 30 kDa, was mit der berechneten Masse übereinstimmt.

### 3.1.9 Nachweis der enzymatischen Aktivität von gereinigtem rekombinantem Granzym B aus *P. pastoris*

Die enzymatische Aktivität der in *P. pastoris* exprimierten Granzym B-Konstrukte (1) und (2) wurde anhand der Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 *in vitro* untersucht (2.2.3.12). Abbildung 3.7 A zeigt die Western blot Analyse von Spaltansätzen beider Proteinpräparationen, die jeweils gleiche Volumina Granzym B-Lösung zusammen mit 100 ng rekombinanter Procaspase-3 aus *E. coli* enthielten. Beide Granzym B-Proteine besaßen enzymatische Aktivität und konnten Caspase-3 spalten, was durch das Auftreten der p12 Caspase-3 Untereinheit nachgewiesen wurde, die über den C-terminalen Epitop-tag mit dem SWA11-Antikörper detektiert wurde (vgl. 3.1.5). Zu beachten ist dabei jedoch, daß in Ansätzen mit Konstrukt (1) eine 20fach höhere Menge an Protein enthalten war als in Ansätzen mit Konstrukt (2). Während die Behandlung von 100 ng bzw. 74 nM Caspase-3 mit 5 ng entspr.

3,1 nM Granzym B (2) bereits zur vollständigen Spaltung führte, d.h. keine Procaspase-3 mehr detektiert wurde, war selbst mit 10 µg Granzym B (1) entspr. 6,25 µM noch Procaspase-3 vorhanden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Prozessierung des Signalpeptids bei Konstrukt (1) tatsächlich nur unvollständig erfolgt und die zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus von Granzym B die enzymatische Aktivität blockieren. Alle weiteren in dieser Arbeit hergestellten Granzym B-Derivate wurden daher analog zu GrB (2) konstruiert bzw. von Konstrukt (2) abgeleitet und weisen im Bereich der KEX2-Spaltstelle die Deletion der vier Vektor-kodierten Aminosäuren Glu-Ala-Glu-Ala auf.

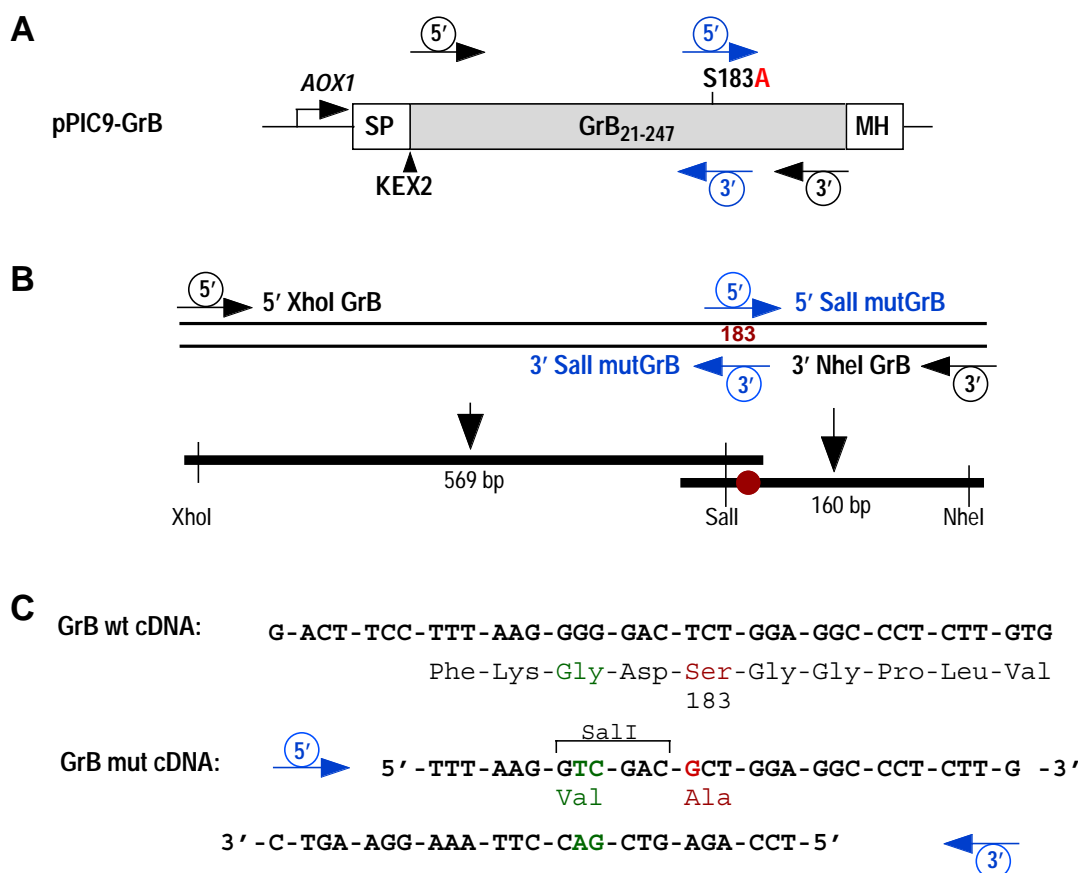


**Abb. 3.7 Rekombinantes Granzym B aus *Pichia pastoris* ist enzymatisch aktiv und spaltet Procaspase-3 *in vitro*.** Gereinigtes Granzym B, das aus *Pichia* Expressionskulturen mit den Konstrukten (1) und (2) gewonnen wurde, wurde mit rekombinanter Procaspase-3 inkubiert. Die Abspaltung der p12 Caspase-3 Untereinheit wurde über SDS-PAGE und Western blot analysiert. **A**, Je 100 ng Caspase-3 (entspr. 74 nM) wurden mit 0,1, 1 und 10 µg Granzym B (Konstrukt 1) bzw. 5, 50 und 500 ng Granzym B (Konstrukt 2) behandelt. **B**, Die Spaltung von Caspase-3 durch Granzym B kann mit dem spezifischen Peptidinhibitor Ac-IETD-CHO gehemmt werden. 5 und 50 ng Granzym B (Konstrukt 2) wurden mit 100 µM Inhibitor 15 min. bei Raumtemperatur vor Zugabe von 100 µg Caspase-3 je Spaltansatz vorinkubiert.

Die Spaltung von Caspase-3 durch Granzym B, das aus *Pichia* Expressionskulturen gereinigt wurde, kann durch den spezifischen Granzym B-Inhibitor Ac-IETD-CHO inhibiert werden (Abb. 3.7 B). 5 und 50 ng Granzym B (entspr. 2,5 und 25 nM), das mit Konstrukt (2) gewonnen wurde, wurden mit 100 µM Peptidinhibitor 15 min. vor Zugabe von Caspase-3 vorinkubiert. Die Ansätze wurden anschließend über Nacht inkubiert und durch SDS-PAGE und Western blot analysiert. Während ohne Inhibitor das p12 Spaltprodukt eindeutig nachgewiesen werden konnte, wurde die Bildung von p12 Caspase-3 durch den Granzym B-spezifischen Aldehyd-Inhibitor vollständig verhindert. Der fünffach konzentrierte Überstand einer Vektor-transformierten *Pichia* Kultur enthielt dagegen keine Aktivität, die zur Spaltung von Caspase-3 und Bildung der p12 Untereinheit führt (nicht gezeigt). Die Spaltung von Caspase-3 ist daher eindeutig auf die enzymatische Aktivität von rekombinantem Granzym B zurückzuführen.

### 3.1.10 Herstellung einer enzymatisch inaktiven Granzym B Mutante GrB S183A

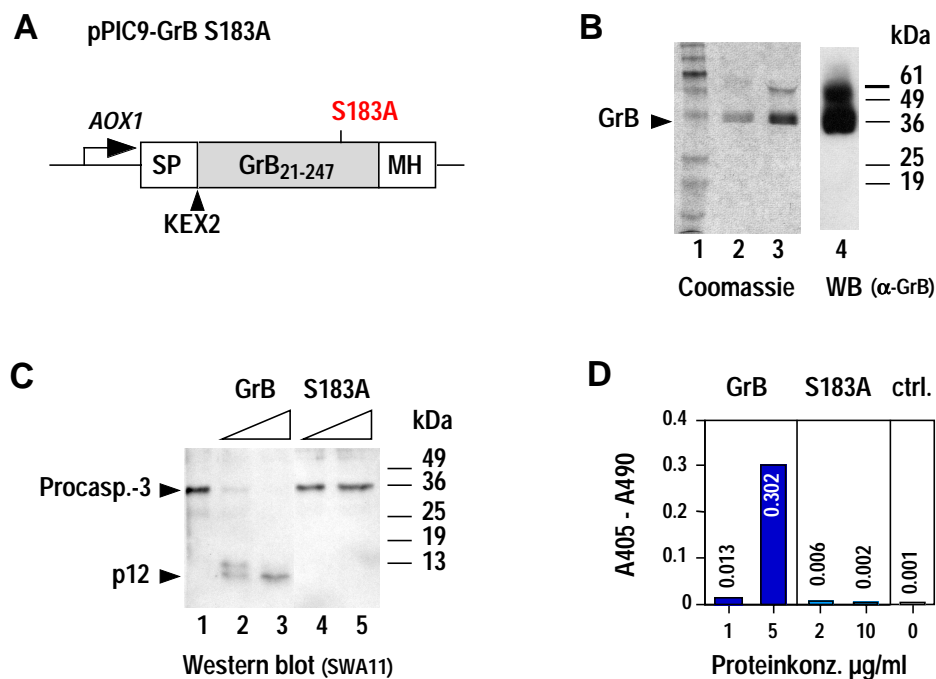
Als Negativkontrolle für weitere Experimente mit rekombinantem Granzym B wurde eine enzymatisch inaktive Punktmutante hergestellt, die in der Literatur beschrieben war [Caputo, 1994]. Das katalytisch aktive Serin 183 wurde dazu gegen ein Alanin ausgetauscht; die resultierende Mutante GrB S183A ist nicht mehr in der Lage, die Spaltung von Peptidbindungen zu katalysieren. Wie in Abb. 3.8 dargestellt, wurde in der cDNA von Granzym B das für Serin kodierende DNA Basentriplett TCT mithilfe einer PCR-Strategie in das für Alanin kodierende GCT umgewandelt. Außerdem wurde eine zusätzliche SalI Schnittstelle neben das neu erzeugte Alanin eingefügt, um das cDNA Teilstück, das die Punktmutation trägt, in den Expressionsvektor pPIC9 subklonieren zu können.



**Abb. 3.8 Einfügen der Ser 183 Ala Punktmutation in die cDNA von Granzym B durch gezielte Mutagenese.** A, Ableitung der für die Polymerase-Kettenreaktion verwendeten primer. Die PCR wurde an dem *Pichia* Expressionsplasmid pPIC9Δ[GrBmh] durchgeführt. B, Schematische Darstellung der PCR. Mit den primern „5' SalI mutGrB“ und „3' NheI GrB“ wurde ein 160 bp PCR-Produkt erzeugt, das anstelle des Ser 183 ein Alanin kodiert (rot). Zusätzlich wurde eine SalI site (grün) eingeführt, die die Subklonierung dieses DNA-Fragments erlaubt. Ein zweites PCR-Produkt wurde mit den primern „5' XhoI GrB“ und „3' SalI mutGrB“ amplifiziert, wobei über den 3' primer ebenfalls eine SalI site erzeugt wurde. C, Wildtyp GrB DNA-Sequenz im Bereich, der für das katalytisch aktive Serin 183 kodiert, und Sequenz der primer 5' SalI mutGrB und 3' SalI mutGrB.

Mithilfe der PCR primer „5' SalI mutGrB“ und „3' NheI GrB“ wurde an pPIC9Δ[GrBmh] zunächst bei einer Hybridisierungstemperatur von 50°C ein 160 bp DNA-Fragment amplifiziert, das anschließend als 3' primer zusammen mit „5' XhoI GrB“ bei einer Hybridi-

sierungstemperatur von 48°C in einer weiteren PCR an pPIC9Δ[GrBmh] eingesetzt wurde. Das resultierende Produkt wurde über die XhoI und NheI sites zwischen die XhoI und XbaI sites von pBIKSmh inseriert. In diesem Vektor wird an das 3' Ende der GrB S183A cDNA die Sequenz für ein Myc-Epitop und einen Hexahistidin-tag angefügt. Das gesamte GrB S183A-myc-his Konstrukt wurde als XhoI, NotI-Fragment in die entsprechenden sites von pPIC9 ligiert und durch Sequenzierung verifiziert. *Pichia pastoris* GS115 wurden mit dem resultierenden Plasmid pPIC9Δ[GrB S183Amh] (Abb. 3.9 A) transformiert, und Klone, die das Konstrukt stabil in das Hefegenom integriert hatten, wurden durch PCR und Mini-Expression identifiziert.



**Abb. 3.9 Produktion einer enzymatisch inaktiven Form von Granzym B.** Das katalytisch aktive Ser183 wurde wie im Text beschrieben durch Einführen einer gezielten Punktmutation zu Ala geändert. Das entsprechende Expressionskonstrukt (**A**) wurde in *P. pastoris* transformiert und rekombinantes Protein aus Expressionskulturen gereinigt. SP: Sequenz kodierend für das Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktors aus *S. cerevisiae*; MH: Myc-Epitop und Hexahistidin-tag. **B**, Coomassie gefärbtes SDS-Gel und Western blot von gereinigtem GrB S183A (Spuren 2,3: 0,4 und 1  $\mu$ g Protein). Der Western blot wurde mit monoklonalem anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) entwickelt. **C, D, GrB S183A spaltet weder Caspase-3 noch ein colorimetrisches Peptidsubstrat.** **C**, Die Caspase-3 Spaltansätze enthielten 100 ng entspr. 74 nM rekombinante Caspase-3 und je 6,25 und 31,25 nM GrB bzw. GrB S183A. **D**, 1 und 5  $\mu$ g/ml GrB (entspr. 25 und 125 nM) bzw. 2 und 10  $\mu$ g/ml GrB S183A (entspr. 50 und 250 nM) wurden mit 200  $\mu$ M Ac-IETD-pNA 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die Abspaltung von p-Nitroanilin wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm gemessen. Ctrl.: PBS anstatt Protein.

Zur präparativen Expression von GrB S183A in *Pichia pastoris* wurden Expressionskulturen wie unter 2.2.3.3 beschrieben herangezogen. Das rekombinante Protein wurde aus dem Kulturüberstand über native  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt (2.2.3.6). Abbildung 3.9 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel sowie einen Western blot von gereinigtem GrB S183A. Der Western blot wurde mit einem monoklonalen anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) entwickelt, der erst während der zweiten Hälfte der Arbeit kommerziell erhält-

lich war. Die Ausbeute an gereinigtem Protein betrug ca. 2 bis 4 mg je Liter Expressionskultur.

Im Vergleich zu enzymatisch aktivem wildtyp Granzym B, das wie unter 3.1.8 beschrieben hergestellt wurde, wurde untersucht, ob die Mutante GrB S183A tatsächlich inaktiv ist. Abbildung 3.9 C zeigt die proteolytische Aktivität beider Proteine gegenüber rekombinanter Caspase-3. Während Granzym B wie zuvor gezeigt Caspase-3 spaltet, findet keine Proteolyse durch gleiche Konzentrationen an GrB S183A statt.

Nachdem ein colorimetrisches Peptidsubstrat für Granzym B verfügbar war, das nach Spaltung direkt zu einer Farbentwicklung führt, wurde dieses Substrat ebenfalls zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von rekombinantem Granzym B oder seiner Varianten verwendet. Das Tetrapeptid Ac-IETD-pNA (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-Nitroanilid) wurde wie unter 2.2.3.12 beschrieben als Substrat für Granzym B sowie GrB S183A eingesetzt. Die Hydrolyse der Asp-Nitroanilid-Bindung führt zur Freisetzung von p-Nitroanilin und Gelbfärbung der Lösung, was durch die Messung der Extinktion bei 405 nm quantifiziert werden kann. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis, das mit Caspase-3 als Substrat erzielt wurde, besitzt die Mutante GrB S183A keine enzymatische Aktivität und ist nicht in der Lage, das Tetrapeptid Ac-IETD-pNA zu spalten (Abbildung 3.9 D).

### 3.1.11 Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.8 bis 3.1.10

Rekombinantes, enzymatisch aktives Granzym B konnte in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt und als natives Protein aus Kulturüberständen von Expressionskulturen gereinigt werden. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der gereinigten Protease konnte ein eigenes *in vitro* System etabliert werden, das auf der Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 aus *E. coli* basiert. Außerdem konnte die Enzymaktivität von Granzym B aus *P. pastoris* mithilfe eines kommerziellen colorimetrischen Peptidsubstrats nachgewiesen werden. Eine enzymatisch inaktive Mutante GrB S183A, die wie aktives Granzym B in *P. pastoris* exprimiert und aus Kulturüberständen gereinigt wurde, besitzt dagegen keine proteolytische Aktivität weder gegenüber rekombinanter Caspase-3 noch gegenüber dem Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA.

## 3.2 Funktionelle Charakterisierung von rekombinantem Granzym B aus *Pichia pastoris*

Zu Beginn der Arbeit war nur relativ wenig über den Mechanismus bekannt, wie Granzym B in Zielzellen eindringt und dort Apoptose initiiert. In dem Modell, das den Stand der Literatur zu Beginn der Arbeit widerspiegelt, ging man davon aus, daß Granzym B durch Perforin-Poren in Zielzellen diffundiert oder über einen anderen unbekannten Mechanismus mithilfe von Perforin in Zellen eindringt und durch Spaltung von Caspase-3 Apoptose induziert. Die Funktion von Perforin kann durch Adenovirus [Froelich, 1996b] oder bakterielle porenbildende Toxine [Browne, 1999] ersetzt werden. Über welchen Weg Granzym B in Zellen aufgenommen

wird und ob es eine eigene Zellbindungsdomäne besitzt, war dagegen unbekannt. Im vorigen Kapitel wurde beschrieben, daß Granzym B rekombinant in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert werden konnte und enzymatische Aktivität *in vitro* besitzt. Zur weitergehenden Charakterisierung des rekombinanten Proteins war es darüber hinaus interessant zu untersuchen, ob Granzym B aus *Pichia pastoris* nicht nur Substrate *in vitro* spaltet, sondern auch als physiologischen Effekt Apoptose in Zielzellen initiieren kann. Für die Granzym B-vermittelte Induktion von Apoptose ist jedoch zusätzlich Perforin notwendig. Dieses Molekül ist allerdings nach wie vor nicht kommerziell erhältlich; für die in der Literatur beschriebenen Arbeiten mit Perforin wurde gereinigtes Protein aus NK-Zelllinien verwendet, das im Wesentlichen von einer Gruppe isoliert wurde [Shi, 2000]. Die besondere Schwierigkeit bei der Reinigung und Handhabung von Perforin liegt offenbar darin, daß das Molekül sehr instabil ist und eine hohe Tendenz zur Bildung von Aggregaten aufweist. Längere Inkubation des Proteins bei Raumtemperatur sowie wiederholtes Auftauen und Einfrieren führen zum Verlust der Aktivität [Shi, 2000]. Der Versuch, gereinigtes Perforin zu erhalten, war nicht erfolgreich. Daher wurden zwei weitere bakterielle porenbildende Toxine als möglicher Ersatz für Perforin zur Induktion Granzym B-vermittelter Apoptose getestet. Mit der Verfügbarkeit von rekombinantem Granzym B in größeren Mengen war es darüber hinaus möglich, den Effekt von Granzym B auf Gewebekulturzellen in Abwesenheit von Perforin zu untersuchen.

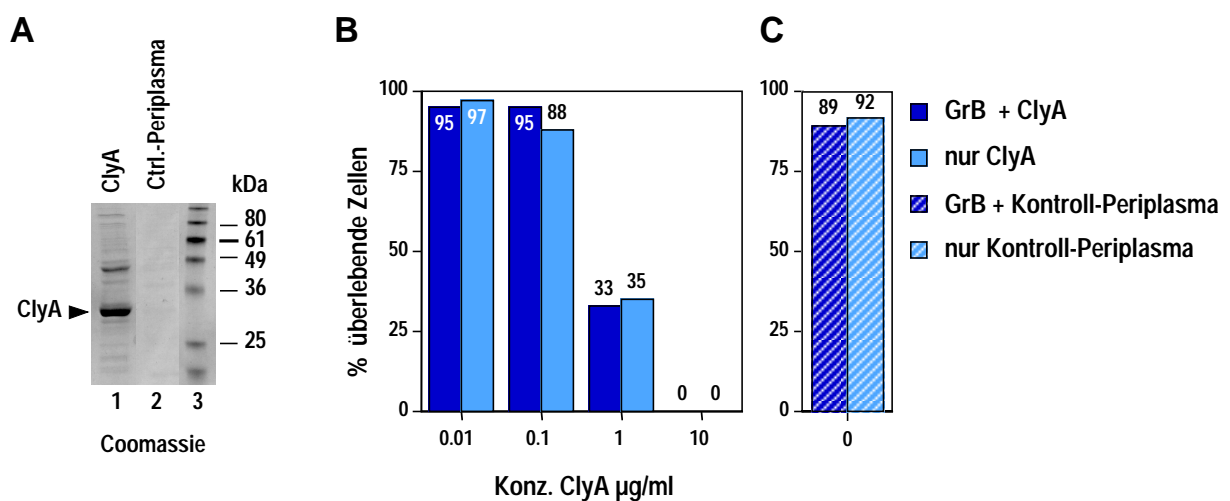
### 3.2.1 *E. coli* Cytolysin A als potentieller Ersatz für Perforin zur Induktion von Apoptose durch Granzym B

Wie unter 3.1 beschrieben wurde, konnte humanes Granzym B in der Hefe *Pichia pastoris* heterolog exprimiert werden, das enzymatisch aktiv ist und Caspase-3 *in vitro* spaltet. Zur weiteren Charakterisierung des rekombinanten Granzym B wurde über den *in vitro* Nachweis der enzymatischen Aktivität hinausgehend untersucht, ob das gereinigte Protein in der Lage ist, Apoptose in Zielzellen zu induzieren. Um Granzym B Zugang zu Proteinsubstraten im Zytoplasma von Zielzellen zu gewähren, deren Spaltung zur Induktion des apoptotischen Zelltod-Programms führt, ist jedoch Perforin oder ein anderes Transduktionsreagens notwendig. Die Funktion von Perforin während der Granzym B-vermittelten Induktion von Apoptose kann durch Replikations-inkompetente Formen von Adenovirus ersetzt werden [Froelich, 1996b]. Darüber hinaus können verschiedene bakterielle porenbildende Toxine anstelle von Perforin eingesetzt werden [Browne, 1999]; dazu gehören die strukturell ähnlichen lytischen Toxine Streptolysin O, Pneumolysin und Listeriolysin O, das besonders bei niedrigem pH im Endosom aktiv ist.  $\alpha$ -Toxin von *Staphylococcus aureus*, das sich sowohl in der Struktur als auch in seiner Funktionsweise von den vorherigen Toxinen unterscheidet, hämolytisches Komplement, das hinsichtlich der Größe der gebildeten Poren und deren Topologie Perforin sehr ähnlich ist, sowie Detergentien konnten dagegen jedoch nicht die Funktion von Perforin übernehmen [Browne, 1999].

Da Perforin für diese Arbeit nicht zur Verfügung stand, wurden zwei weitere bakterielle Toxine als möglicher Ersatz für Perforin untersucht, um ein Nachweissystem der Apoptose-induzierenden Aktivität von rekombinantem Granzym B etablieren zu können. *E. coli*  $\alpha$ -Hämolysin (HlyA) bildet „dynamische“ Poren, deren Größe konzentrationsabhängig ist. Es ist Perforin strukturell sehr ähnlich, hat aber eine sehr hohe Tendenz zur Bildung von Aggregaten und ist daher extrem instabil und schwierig zu handhaben. Das Toxin wird von verschiedenen pathogenen *E. coli* Stämmen produziert und über ein spezifisches Sekretions-

system sekretiert. Ein *E. coli* Klon, der das  $\alpha$ -Hämolysin-Gen exprimiert und das Protein in das Kulturmedium sekretiert, wurde freundlicherweise von A. Ludwig, Frankfurt zur Verfügung gestellt. Aufgrund der Labilität des Toxins wurde  $\alpha$ -Hämolysin enthaltender Kulturüberstand direkt ohne vorherige Reinigung des Proteins eingesetzt. Nach Behandlung von HeLa Zellen mit rekombinantem Granzym B aus *Pichia pastoris* und Überstand von  $\alpha$ -Hämolysin-exprimierenden *E. coli* Kulturen konnte jedoch keine spezifische Induktion von Apoptose nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Ein weiteres *E. coli* Hämolysin, Cytolysin A (ClyA), das über einen längeren Zeitraum stabil ist und Poren definierter Größe bildet, wurde ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit auf seine Verwendbarkeit als Perforin-Ersatz untersucht. Ein *E. coli* DH5 $\alpha$  Klon, der das ClyA-Gen im Vektor pUC18 enthält (pUC18[ClyA]) [Ludwig, 1999], wurde von A. Ludwig zur Verfügung gestellt. Das Toxin wird in *E. coli* Kulturen im periplasmatischen Raum akkumuliert und bildet den Hauptproteinanteil im Periplasma, so daß anstelle von gereinigtem Cytolysin A Periplasmaextrakt von über-Nacht-Kulturen verwendet wurde. Abbildung 3.10 A zeigt ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel, auf dem Periplasma einer ClyA-Kultur neben Periplasmaextrakt einer DH5 $\alpha$ -Kultur, die mit leerem pUC18 transformiert war, aufgetrennt wurde. Im Periplasma der ClyA-Kultur ist als Hauptbestandteil das 34 kDa ClyA zu sehen, während im Kontrollperiplasma praktisch kein Protein angefärbt wird. Die Konzentration an ClyA betrug ca. 200  $\mu$ g/ml.



**Abb. 3.10 *E. coli* Cytolysin A als möglicher Ersatz für Perforin zur Induktion von Apoptose durch Granzym B.** **A**, Coomassie gefärbtes SDS-Gel von je 5  $\mu$ l Periplasmaextrakt einer *E. coli* Kultur, die mit pUC18[ClyA] (Spur 1) bzw. pUC18 (Ctrl., Spur 2) transformiert war. Spur 1: 1  $\mu$ g ClyA (34 kDa). **B**, **C**, MTT Proliferations-assay. HeLa Zellen wurden mit 1  $\mu$ g/ml rekombinantem Granzym B und ClyA-haltigem Periplasma (**B**) bzw. Periplasma einer Vektor-transformierten *E. coli* Kultur (**C**) über Nacht behandelt. Die Überlebensrate wurde durch Zugabe von MTT und Messung der Extinktion bei 590 nm relativ zu unbehandelten Zellen bestimmt. Für **C** wurden Volumina an Kontrollperiplasma eingesetzt, die 10  $\mu$ g/ml ClyA-Periplasma entsprechen.

Diese ClyA-Präparationen wurden in Zytotoxizitätstests (2.2.4.4) zusammen mit rekombinantem Granzym B eingesetzt. Dazu wurden HeLa Zellen mit 1  $\mu$ g/ml Granzym B und ClyA-

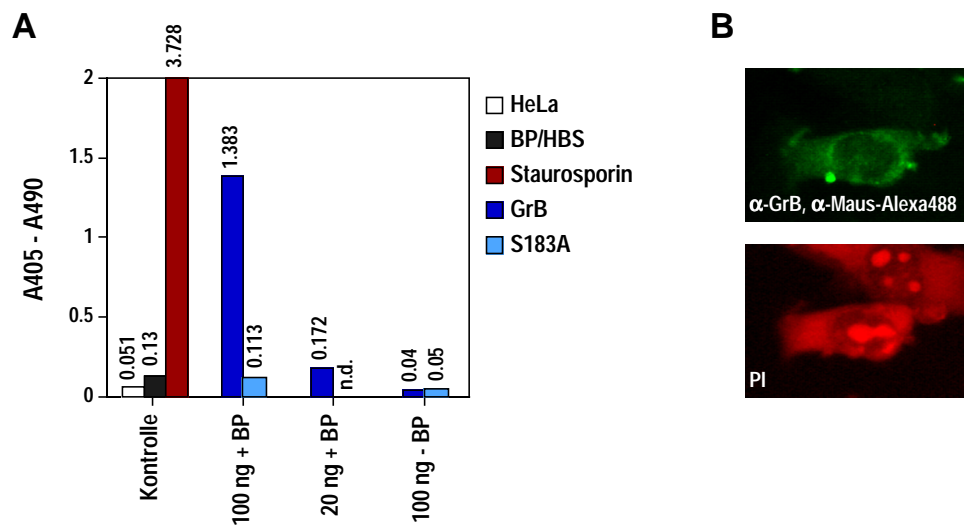


haltigem Periplasma bzw. nur ClyA-Periplasma in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Die Überlebensrate relativ zu unbehandelten Zellen wurde nach 20 Stunden durch Zugabe von MTT und Messung der Extinktion bei 590 nm bestimmt. Wie in Abbildung 3.10 B dargestellt, übt Cytolysin A jedoch bereits alleine eine Konzentrations-abhängige toxische Wirkung auf HeLa Zellen aus. 1 µg/ml ClyA führt zum Überleben von nur noch 35% der Zellen, während 0,1 µg/ml ClyA praktisch keinen toxischen Effekt mehr zeigt. Durch gleichzeitige Behandlung von HeLa Zellen mit sublytischer Konzentration an ClyA (0,1 µg/ml) und 1 µg/ml Granzym B (wie in der Literatur üblicherweise sublytische Konzentrationen an Perforin zusammen mit 1 µg/ml Granzym B eingesetzt werden) konnte jedoch kein synergistischer toxischer Effekt beobachtet werden, d.h. die Gegenwart sublytischer Mengen an ClyA führt nicht zur Induktion von apoptotischem Zelltod durch Granzym B. Die Behandlung von HeLa Zellen mit Granzym B und 1 µg/ml ClyA führt ebenfalls nicht zu einer erhöhten Zytotoxizitätsrate (33% überlebenden Zellen im Vergleich zu 35% ohne Granzym B). Kontroll-Periplasma, das aus einer mit dem leeren Vektor pUC18 transformierten Kultur gewonnen wurde, besitzt keine zytotoxische Wirkung auf HeLa Zellen (Abb. 3.10 C). Die eingesetzte Konzentration an Granzym B von 1 µg/ml entspricht dabei derjenigen, die in der Literatur üblicherweise für das Granzym B/Perforin System beschrieben wird.

### **3.2.2 Induktion von Apoptose in HeLa Zellen durch rekombinantes Granzym B nach Einschleusen in Zellen mithilfe des BioPORTER Reagens**

Das kationische Lipid-basierende Reagens BioPORTER (Gene Therapy Systems), das erst in der zweiten Hälfte dieser Arbeit kommerziell zur Verfügung stand, ist in der Lage, eine Vielzahl funktionaler Proteine, Peptide oder Antikörper in verschiedene Zelltypen einzuschleusen. Die Transduktion von Zellen mit aktiven Caspasen führt zur Induktion von Apoptose [Zelphati, 2001], was als Nachweis dafür dient, daß Proteine unter Erhalt ihrer physiologischen Funktion in Zellen transportiert werden. Da die Funktion von Perforin wie im vorigen Abschnitt gezeigt nicht durch die bakteriellen Toxine Cytolysin A und  $\alpha$ -Hämolysin ersetzt werden konnte, wurde das Transduktionsreagens BioPORTER verwendet, um zu untersuchen, ob rekombinantes Granzym B aus *Pichia pastoris* Apoptose in Zielzellen induzieren kann.

Um zu überprüfen, ob Granzym B mithilfe des BioPORTER Reagens in das Zytoplasma von HeLa Zellen eingeschleust werden kann, wurden HeLa Zellen auf „8 well“ Objektträgern ausgesät und mit 100 ng Granzym B, das nach Vorschrift des Herstellers wie unter 2.2.4.7 beschrieben mit BioPORTER komplexiert wurde, behandelt. Nach vierstündiger Inkubation der Zellen bei 37°C ist nach Herstellerangaben üblicherweise die maximale intrazelluläre Konzentration des einzuschleusenden Proteins erreicht. Die Zellen wurden daher zu diesem Zeitpunkt fixiert und durch Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) analysiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid angefärbt. Abbildung 3.11 B zeigt die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung von Granzym B in einer HeLa Zelle nach Behandlung mit Granzym B-BioPORTER-Komplexen.



**Abb. 3.11 A, Induktion von Apoptose in HeLa Zellen durch Granzym B-BioPORTER-Komplexe.** HeLa Zellen wurden mit Komplexen aus 100 bzw. 20 ng Protein in HBS-Puffer und BioPORTER in einem Volumen von 100  $\mu$ l behandelt und über Nacht inkubiert. Die Induktion von apoptotischem Zelltod wurde mit dem „Cell death detection ELISA plus“ kit (Roche) analysiert. BP: BioPORTER Reagens, Staurosporin: 1  $\mu$ M. **B, Nachweis von Granzym B im Zytoplasma von HeLa Zellen nach Transduktion mit BioPORTER Reagens.** HeLa Zellen wurden mit Komplexen aus BioPORTER und 100 ng Granzym B für 4 Std. behandelt. Granzym B wurde über Immunfluoreszenz mit anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (PI) angefärbt.

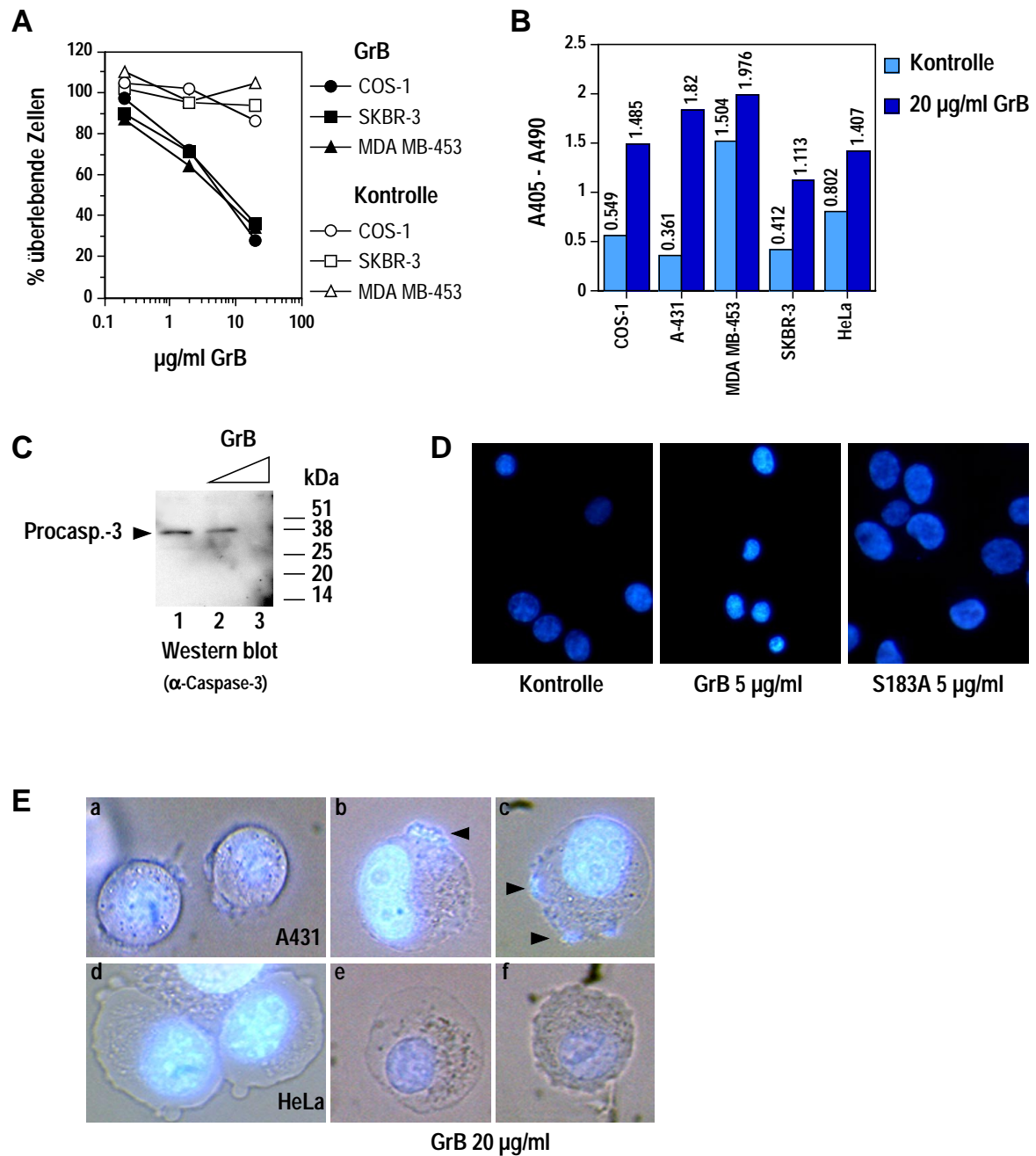
Zur Induktion von Apoptose wurden HeLa Zellen in 96 well Gewebekulturschalen mit Komplexen aus 100 und 20 ng Granzym B bzw. der inaktiven Mutante GrB S183A und BioPORTER behandelt. Nach Inkubation der Zellen über Nacht wurde Apoptose mithilfe des „Cell death detection ELISA plus“ kit (Roche) nachgewiesen (Abbildung 3.11 A). Dieser Apoptose-Nachweis basiert auf der Fragmentierung der zellulären DNA und Freisetzung von Nukleosomen ins Zytoplasma apoptotischer Zellen. In einem ELISA werden die Nukleosomen in zytoplasmatischen Extrakten durch anti-DNA und anti-Histon-Antikörper immobilisiert und nachgewiesen. In Abb. 3.11 A sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die einzelnen Ansätze wurden in Duplikaten gemessen, die Zahlenwerte sind Mittelwerte der Einzelmeßergebnisse. Während die Behandlung von Zellen mit BioPORTER ohne relevantes Protein (HBS-Puffer als Negativkontrolle) keinen zytotoxischen Effekt zeigt, führt die Inkubation mit Granzym B-BioPORTER-Komplexen zur konzentrationsabhängigen Induktion von apoptotischem Zelltod. Die gleiche Menge an Granzym B, das nicht komplexiert wurde, initiiert dagegen keine Apoptose. Die Behandlung von HeLa Zellen mit Komplexen aus BioPORTER und der inaktiven Mutante Granzym B S183A führt ebenfalls nicht zu DNA-Fragmentierung und Freisetzung von Nukleosomen ins Zytoplasma. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1  $\mu$ M Staurosporin über Nacht behandelt, das durch Inhibierung von Protein-Kinasen, insbesondere der Protein-Kinase C, apoptotischen Zelltod induziert.

### 3.2.3 Effekte von rekombinantem Granzym B auf Gewebekulturzellen in Abwesenheit von Perforin

Mit der Verfügbarkeit größerer Mengen an rekombinantem Granzym B war es außerdem möglich, in Zellkultur-Experimenten zu untersuchen, ob bzw. welchen Effekt die Protease alleine auf Zellen ausübt. Interessanterweise wiesen verschiedene adhärenzte Tumorzelllinien nach Behandlung mit Granzym B in Konzentrationen über 1 µg/ml auffallende morphologische Veränderungen auf („Abkugeln“ der Zellen, vgl. 3.2.5). Nach Inkubationszeiten von ein bis zwei Tagen war eine deutliche Zytotoxizität meßbar. Abbildung 3.12 A zeigt einen MTT Zytotoxizitätstest, der mit den humanen Mammakarzinom Zelllinien MDA-MB 453 und SKBR-3 sowie der Affen-Nierenfibroblasten Zelllinie COS-1 durchgeführt wurde. Die Zellen, die zuvor durch Trypsin-Behandlung von der Kulturschale abgelöst worden waren, wurden in 96 well Gewebekulturschalen in einer Dichte von  $10^4$  (COS-1) bzw.  $2 \times 10^4$  (MDA-MB 453, SKBR-3) wie unter 2.2.4.4 beschrieben mit 0,2, 2 und 20 µg/ml gereinigtem Granzym B für zwei Tage behandelt. Als Kontrolle wurden entsprechende Volumina des PBS-Puffers eingesetzt, der für den letzten Dialyseschritt nach der Reinigung von Granzym B verwendet wurde. Insbesondere bei einer Konzentration von 20 µg/ml hat Granzym B einen deutlichen wachstumshemmenden Effekt auf alle drei untersuchten Zelllinien, nach zwei Tagen sind nur noch 30% lebende Zellen im Vergleich zu den Kontrollansätzen vorhanden. Nach Behandlung mit 2 µg/ml Granzym B werden noch ca. 70% lebende Zellen gemessen.

Ob es sich bei diesem Effekt um die Induktion von apoptotischem Zelltod durch Granzym B handelt, wurde mithilfe des „Cell death detection ELISA plus“ kit (Roche) analysiert (2.2.4.5). In Abbildung 3.12 B sind die Ergebnisse verschiedener Experimente mit den Tumorzelllinien COS-1, A-431, MDA-MB 453, SKBR-3 und HeLa dargestellt. Alle Zelllinien wurden mit 20 µg/ml Granzym B behandelt, die Inkubationszeit betrug einen (COS-1, A-431, HeLa) bzw. zwei (SKBR-3, MDA-MB 453) Tage. Während HeLa Zellen vor Zugabe von Granzym B über Nacht in der 96 well Platte zum Anheften kultiviert wurden, wurden die übrigen Zellen direkt nach Trypsinierung mit Granzym B behandelt. Als Kontrolle wurde PBS eingesetzt. In allen untersuchten Zelllinien konnten nach Einwirken von Granzym B eindeutig Nukleosomen im Zytoplasma als Folge von DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden, was auf die Induktion von Apoptose durch Granzym B hinweist.

Als weitere Merkmale von apoptotischem Zelltod wurden die Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 sowie morphologische Veränderungen des Zellkerns zum Nachweis von Apoptose herangezogen. Um zu untersuchen, ob Zellen nach Behandlung mit Granzym B gespaltene Caspase-3 enthalten, wurden SKBR-3 Zellen in einer 96 well Gewebekulturschale mit 2 und 20 µg/ml Granzym B über Nacht behandelt. Die Zellen wurden anschließend in 50 µl RIPA-Puffer je well für 60 min. auf Eis lysiert (2.2.4.2), Membranen und Zellkerne wurden für 10 min. bei 14000 Upm abzentrifugiert. Von dem gewonnenen Gesamtzellextrakt wurden jeweils 10 µl auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. Der mit anti-Caspase-3 Antikörper entwickelte Western blot ist in Abbildung 3.12 C dargestellt. In Lysat von unbehandelten Zellen wurde wie erwartet die Proform von Caspase-3 als 32 kDa Protein detektiert (Spur 1), die auch nach Behandlung mit 2 µg/ml Granzym B noch vorhanden war (Spur 2). Im Extrakt der mit 20 µg/ml Granzym B behandelten Zellen konnte jedoch keine Procaspase-3 mehr nachgewiesen werden (Spur 3), was darauf hindeutet, daß die Spaltung von Procaspase-3 in die p12 und p20 bzw. p17 Untereinheiten erfolgt war. Der für den Western blot verwendete



**Abbildung 3.12 Einfluß von Granzym B auf das Wachstum etablierter Tumorzelllinien und Anzeichen von Apoptose.** **A, MTT Proliferations-assay.** Drei Tumorzelllinien wurden mit Granzym B oder PBS (Kontrolle) für 2 Tage behandelt. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurde MTT zugegeben und die Farbentwicklung nach Metabolisierung durch lebende Zellen über Messung der Extinktion bei 590 nm quantifiziert. **B, Cell death detection ELISA zum Nachweis von Apoptose.** Die Zellen wurden mit Granzym B oder PBS (Kontrolle) für 1 oder 2 Tage behandelt, und Apoptose wurde anhand der Freisetzung von Nukleosomen ins Zytoplasma in einem ELISA detektiert. **C, Nachweis der Spaltung von Caspase-3 in Extrakten Granzym B-behandelter Zellen.**  $2 \times 10^4$  SKBR-3 Zellen wurden mit 2 und 20 µg/ml Granzym B oder PBS über Nacht behandelt. Die Zellen wurden in 50 µl RIPA-Puffer lysiert und 10 µl des Gesamtzellextrakts wurde durch SDS-PAGE und Western blot mit anti-Caspase-3 Antikörper auf Spaltung von Caspase-3 nach Behandlung mit Granzym B untersucht. **D, E, Hoechst Färbung von Granzym B-behandelten HeLa (D) und A-431 (E) Zellen.** Weitere Angaben siehe Text.

anti-Caspase-3 Antikörper erkennt ein Epitop der p20 Untereinheit. Die Tatsache, daß kein p20 Spaltprodukt im Western blot nachgewiesen werden konnte, ist evtl. mit der zu geringen Menge an p20 sowie der relativ schlechten Bindung kleiner Proteine an die Western blot Membran zu erklären. Entsprechende Experimente mit HeLa oder A-431 Zellen lieferten keine Aussage, da im Western blot von Zellextrakten unbehandelter Zellen keine Procaspase-3 detektiert werden konnte, so daß wesentlich höhere Zellzahlen eingesetzt werden mußten.

Zur Analyse der Kernmorphologie wurden HeLa Zellen in 12 well Gewebekulturschalen ausgesät und über Nacht zum Anheften der Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 5 µg/ml Granzym B oder der enzymatisch inaktiven Mutante GrB S183A für 3 Stunden behandelt (Abbildung 3.12 D). Für das in Abbildung 3.12 E gezeigte Experiment wurden HeLa und A-431 Zellen in 96 well Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und mit 20 µg/ml Granzym B für 24 Stunden behandelt. In beiden Fällen wurde anschließend die Morphologie der Zellkerne nach Anfärben der DNA mit Hoechst 33342 unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (2.2.4.5). Während die Kerne der Granzym B-behandelten HeLa Zellen in Abbildung 3.12 D deutlich kleiner und stärker angefärbt sind als die unbehandelten oder mit der inaktiven Mutante GrB S183A behandelten Zellen, was auf Chromatin-Kondensation und Schrumpfen der Zellkerne hinweist, konnte bei den in Abbildung 3.12 E gezeigten A-431 Zellen Fragmentierung der Zellkerne beobachtet werden (Pfeile in Abb. b und c). Die Kerne der HeLa Zellen in Abbildung 3.12 E, Bilder e und f sind dagegen wie in Abb. 3.12 D im Vergleich zu denen der Kontrollzellen kondensiert.

Diese Daten geben Hinweise darauf, daß rekombinantes Granzym B einen zytotoxischen Effekt auf Kulturen von Tumorzelllinien ausübt, der mit Merkmalen von Apoptose verbunden ist. Dieser Effekt ist offenbar von der „klassischen“ Granzym B-vermittelten Apoptose zu unterscheiden, da er in Abwesenheit von Perforin eintritt. Während nach Angaben in der Literatur gereinigtes Granzym B aus NK-Zellen im Konzentrationsbereich von ca. 1 µg/ml zusammen mit Perforin innerhalb von 2 bis 4 Stunden typische Apoptosemerkmale in Zellen hervorruft [Shi, 2000], tritt der hier beobachtete Effekt erst mit höheren Granzym B-Konzentrationen über 1 µg/ml und bei relativ langen Inkubationszeiten von 24 bis 48 Stunden ein. Ob Granzym B in höheren Konzentrationen entgegen dem gegenwärtig diskutierten Modell doch ohne Perforin in Zellen eindringen und durch Spaltung von Zielproteinen das Apoptose Zelltodprogramm starten kann, wurde daher in den folgenden Immunfluoreszenz-Experimenten untersucht.

### **3.2.4 Untersuchung der Internalisierung und intrazellulären Lokalisation von rekombinantem Granzym B in HeLa Zellen**

Die Beobachtung von Zytotoxizität in Kulturen von Tumorzellen nach Behandlung mit rekombinantem Granzym B ohne Perforin oder einem funktionellen Äquivalent war unerwartet, da ursprünglich angenommen wurde, daß Granzym B ohne Perforin nicht in der Lage ist, in Zielzellen einzudringen, und daher das Apoptose Zelltodprogramm nicht initiieren kann. Neuere Veröffentlichungen beschreiben dagegen die Bindung von Granzym B an und Internalisierung in Jurkat Zellen über hochaffine Bindungsstellen. Die Aufnahme in Jurkat Zellen ist jedoch nicht mit der Induktion von Apoptose verbunden, und Granzym B befindet sich nach Aufnahme durch Endozytose in zytoplasmatischen, Membran-umschlossenen

Vesikeln [Froelich, 1996b; Jans, 1996; Pinkoski, 1998]. Die Funktion von Perforin wird daher als endosomolytisches Agens diskutiert, das für das Eindringen von Granzym B in die Zelle notwendig ist. Wie im vorigen Abschnitt beschrieben, hat rekombinantes Granzym B in höheren Konzentrationen jedoch einen Wachstums-hemmenden Effekt auf Kulturen verschiedener etablierter Tumorzelllinien in Abwesenheit von Perforin. Diese Zellen weisen Anzeichen von apoptotischem Zelltod auf wie DNA-Fragmentierung, Spaltung von Caspase-3 und Chromatinkondensation. Durch Immunfluoreszenzfärbung von HeLa Zellen nach Behandlung mit Granzym B wurde daher untersucht, ob das rekombinante Protein in Abwesenheit von Perforin doch in das Zytoplasma von Zellen aufgenommen werden und dort durch Spaltung von Substraten Apoptose initiieren kann.

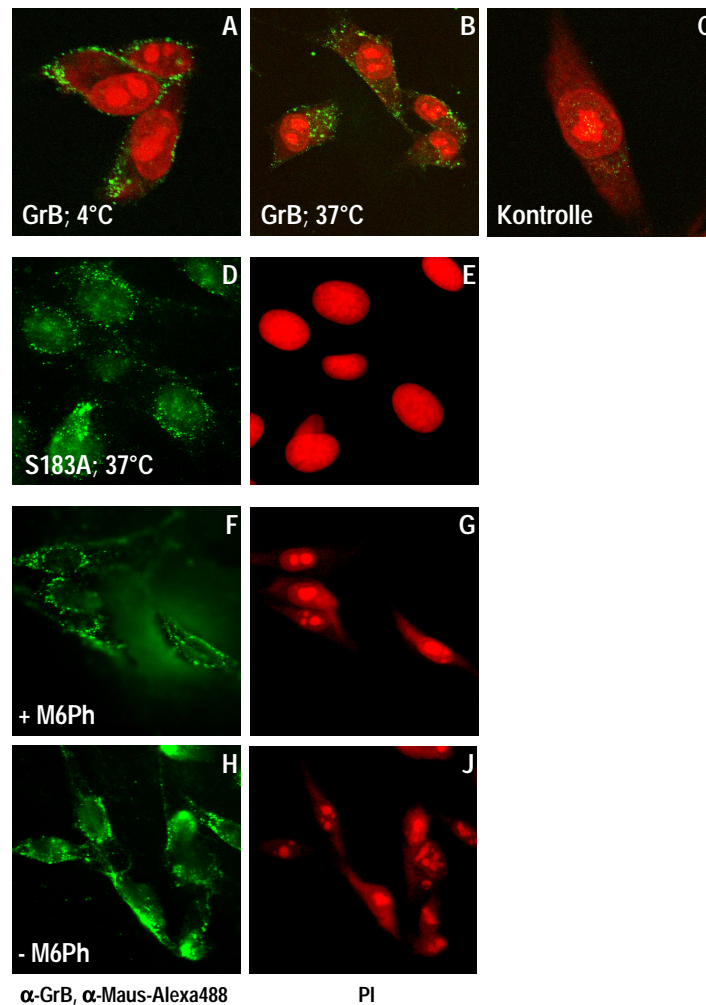
HeLa Zellen wurden dazu auf „8 well“ Objektträgern ausgesät und zum Anheften über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden anschließend mit 10 µg/ml Granzym B behandelt und nach verschiedenen Zeitpunkten fixiert. Die Lokalisation von Granzym B in den Zellen wurde mit anti-Granzym B und Alexa488 Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper bestimmt, die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid angefärbt. Bereits nach kurzer Inkubationszeit bei 37°C war Granzym B eindeutig in den Zellen detektierbar; Abbildung 3.13 B zeigt HeLa Zellen, die für 10 min. mit Granzym B behandelt wurden. Kontroll-Zellen, die mit PBS inkubiert wurden, ergaben kein Fluoreszenzsignal (Abb. 3.13 C). In Übereinstimmung mit den Berichten in der Literatur liegt Granzym B jedoch nicht frei verteilt im Zytoplasma vor, sondern wird als granuläre Strukturen im Zytoplasma behandelter Zellen angefärbt, was auf die Lokalisation des Proteins in Membran-umschlossenen Vesikeln hindeutet. Die Bindung der Protease an Zellen kann nach Inkubation bei 4°C nachgewiesen werden (Abb 3.13 A).

Bindung (nicht gezeigt) und Internalisierung von rekombinantem Granzym B sind nicht abhängig von der enzymatischen Aktivität des Proteins. Abbildung 3.13 D zeigt HeLa Zellen nach Behandlung mit der inaktiven Mutante GrB S183A, die wie wildtyp Granzym B in vesikulären Strukturen im Zytoplasma lokalisiert werden kann.

Als ein Zelloberflächenrezeptor, über den aus NK-Zellen gereinigtes Granzym B in Zellen internalisiert, wurde in einer neuen Veröffentlichung der Mannose-6-Phosphat oder „insulin-like growth factor II“ (IGFII) Rezeptor identifiziert [Motyka, 2000]. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß das rekombinante Granzym B aus *Pichia pastoris* ebenfalls in Zellen aufgenommen wird, d.h. vollständig funktional ist und offenbar die für die Aufnahme in Zellen relevante Mannose-6-Phosphat Modifikation trägt. Allerdings besaßen verschiedene Proteinpräparationen, die aus unterschiedlichen *Pichia* Expressionskulturen gewonnen wurden, variierende Zellbindungsaktivität. Im Gegensatz zu den Präparationen, die für die hier gezeigten Experimente verwendet wurden, wurde gereinigtes Granzym B aus einer anderen Expressionskulturen nicht in Zellen aufgenommen (nicht gezeigt).

In der zitierten Arbeit konnte sowohl die Bindung an als auch die Internalisierung in Jurkat Zellen durch Mannose-6-Phosphat (M6Ph) in einer Konzentration von 20 mM spezifisch inhibiert werden. Es wurden daher ebenfalls Kompetitionsexperimente mit Mannose-6-Phosphat durchgeführt. In dem in Abbildung 3.13 F-J gezeigten Experiment wurden HeLa Zellen mit 100 mM M6Ph vor Zugabe von Granzym B für 10 min. bei Raumtemperatur vorinkubiert. 10 µM Granzym B wurde anschließend in Gegenwart von 100 mM M6Ph zugegeben und für weitere 20 min. bei 37°C inkubiert. Abb. 3.13 F zeigt im Vergleich zu Abb. 3.13 H eine etwas schwächere Färbung der Zellen mit anti-Granzym B Antikörper, was auf eine partielle Inhibierung der Aufnahme durch Mannose-6-Phosphat zurückgeführt werden könnte. Ein entsprechendes Experiment, das bei 4°C zur Analyse der Zellbindung durchgeführt wurde, lieferte ein analoges Ergebnis. Die Zelloberfläche wurde in Gegenwart

von Mannose-6-Phosphat schwächer mit dem Granzym B-spezifischen Antikörper angefärbt als in Abwesenheit des Zuckers, jedoch konnte eine vollständige Hemmung der Zellbindung von Granzym B nicht beobachtet werden (nicht gezeigt). Die Hemmbarkeit der Bindung von Granzym B an und Internalisierung in Zellen konnte damit in der Deutlichkeit wie in der Literatur beschrieben [Motyka, 2000] nicht reproduziert werden, was möglicherweise mit der Qualität des eingesetzten Mannose-6-Phosphats oder Unterschieden in den Zelllinien zu erklären ist. Die Existenz eines weiteren Aufnahmewegs von Granzym B in Zellen wäre eine alternative Interpretationsmöglichkeit.



**Abbildung 3.13 Bindung von rekombinantem Granzym B an (A) und Aufnahme in (B) HeLa Zellen.** A, HeLa Zellen wurden mit 10 µg/ml Granzym B für 10 min. auf Eis bzw. B, C bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zur Lokalisierung von Granzym B mit anti-Granzym B Antikörper und Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper (grün) angefärbt und mit CLSM analysiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (PI) rot angefärbt. Kontrolle: PBS. D-J Fluoreszenzmikroskop-Bilder von HeLa Zellen, die mit der inaktiven Mutante GrB S183A oder mit wildtyp Granzym B und Mannose-6-Phosphat (M6Ph) zur Hemmung der Bindung von Granzym B an die Zellen behandelt wurden. D, E Die enzymatische Aktivität von Granzym B ist für die Internalisierung nicht notwendig. HeLa Zellen wurden mit 1 µg/ml GrB S183A für 1 Std. bei 37°C behandelt und wie zuvor angefärbt. F-J Einfluß von Mannose-6-Phosphat auf die Internalisierung von Granzym B. HeLa Zellen wurden mit 100 mM Mannose-6-Phosphat (stock: 1 M in H<sub>2</sub>O verdünnt in Medium) oder H<sub>2</sub>O entsprechend in Medium verdünnt, für 10 min. bei Raumtemperatur ohne Granzym B vorinkubiert. Granzym B wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml alleine oder in Gegenwart von 100 mM M6Ph auf die Zellen gegeben und für 20 min. bei 37°C inkubiert.

Unabhängig von dem verantwortlichen Rezeptor konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, daß Granzym B in Zellen aufgenommen wird, nach Internalisierung in HeLa Zellen jedoch nicht frei im Zytoplasma vorliegt, sondern in vesikulären Strukturen vorhanden ist. Der unter 3.2.3 beschriebene zytotoxische Effekt von rekombinantem Granzym B auf Kulturen von Tumorzellen ist daher wahrscheinlich nicht auf die intrazelluläre Wirkung der Protease, d.h. Spaltung zytoplasmatischer Substrate zur Initiierung von apoptotischem Zelltod zurückzuführen. Der beobachtete anti-proliferative Effekt von Granzym B auf Zellkulturen wird dagegen interessanterweise begleitet von charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen nach Behandlung mit der Protease, die auf eine mögliche extrazelluläre Aktivität von Granzym B hindeuten und die im Folgenden näher untersucht wurden.

### **3.2.5 Morphologische Veränderungen von Gewebekulturzellen nach Behandlung mit rekombinantem Granzym B**

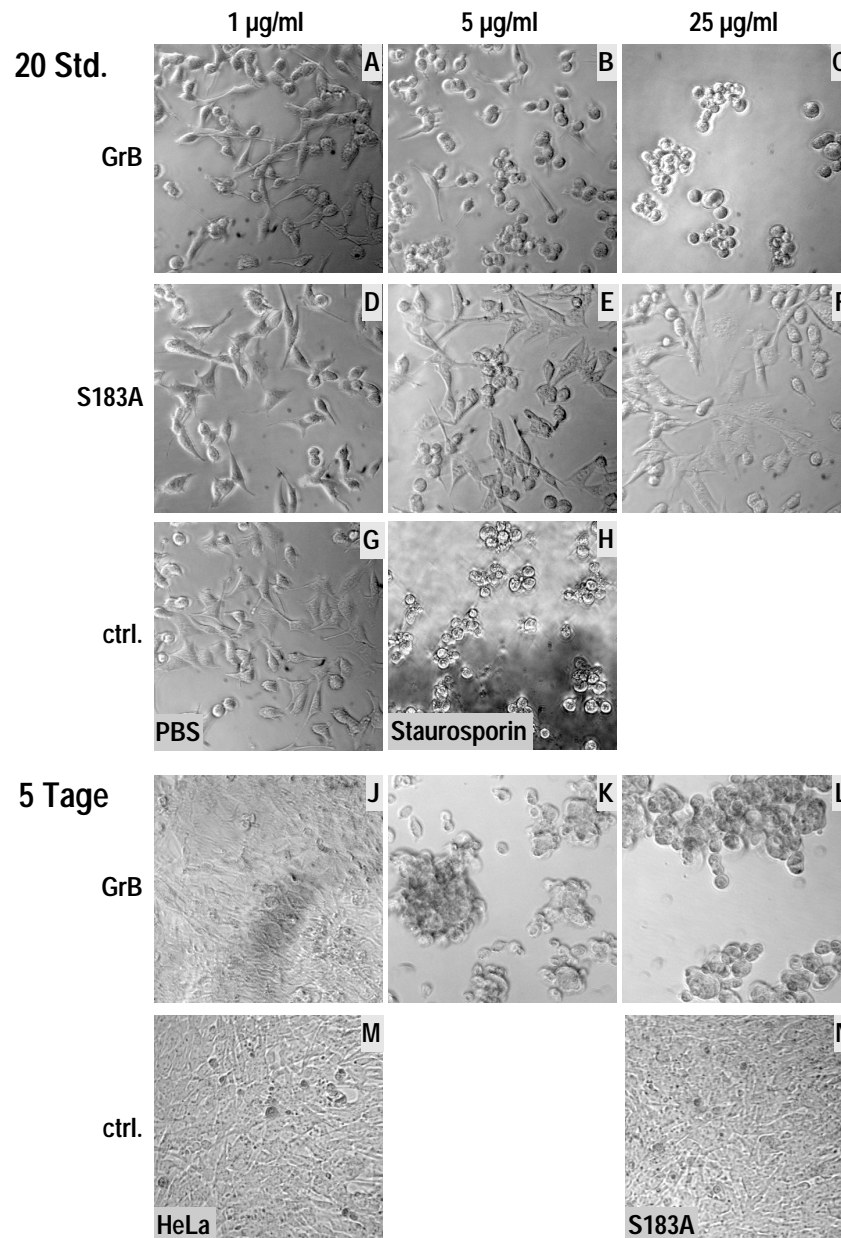
#### ***Abhängigkeit von Konzentration und enzymatischer Aktivität***

Bei der Untersuchung, welchen Effekt rekombinantes Granzym B auf Kulturen etablierter Tumorzelllinien ausübt, wurde beobachtet, daß die Zellen nach Behandlung mit Granzym B über Nacht in höheren Konzentrationen (ab 5 µg/ml) deutliche morphologische Veränderungen zeigen. In Abbildung 3.14 A-C sind HeLa Zellen abgebildet, die für 20 Stunden mit 1, 5 und 25 µg/ml Granzym B inkubiert wurden. Während sich die Zellen in Gegenwart von 1 µg/ml Granzym B praktisch nicht von Kontrollzellen, die mit PBS behandelt wurden (Abb. 3.14 G), unterscheiden, nehmen die Zellen bei einer Granzym B-Konzentration von 5 µg/ml bereits deutlich eine kugelige Gestalt an und bilden nach Einwirken von 25 µg/ml Granzym B Zellklumpen, die nur noch locker an die Kulturschale angeheftet sind. Es konnte jedoch keine Blasenbildung der Zellmembran und ebenfalls keine Abschnürung von „apoptotic bodies“ beobachtet werden, die charakteristische Merkmale von Apoptose darstellen. Als Vergleich für den apoptotischen Phänotyp wurden HeLa Zellen mit 1 µM Staurosporin zur Induktion von Apoptose behandelt (Abb. 3.14 H). Diese Zellen verlieren ebenfalls den Kontakt zur Kulturschale und weisen eine kugelige Morphologie auf, es sind jedoch deutlich „apoptotic bodies“ als kleine Zellfragmente zu erkennen. Das Einwirken von Granzym B auf Kulturen adhärenter Tumorzellen scheint daher nicht direkt mit der Induktion von Apoptose verbunden zu sein, sondern zunächst ein Ablösen der Zellen von der Kulturschale zu bewirken.

Für die beobachtete morphologische Veränderung der Zellen ist die enzymatische Aktivität von Granzym B verantwortlich, da die Behandlung von HeLa Zellen mit entsprechenden Konzentrationen der inaktiven Mutante GrB S183A nicht zum Abkugeln der Zellen führt (Abb. 3.14 D-F). Das Abkugeln der Zellen wird damit offenbar direkt durch Granzym B Aktivität hervorgerufen.

Werden HeLa Zellen in Gegenwart von 5 µg/ml Granzym B oder höheren Granzym B-Konzentrationen über mehrere Tage kultiviert (Abb. 3.14 J-L), tritt keine „Erholung“ der Zellen mit der Zeit ein. Die kugelige Zellmorphologie wird dagegen erhalten, und das Einwirken von Granzym B führt offensichtlich zur Zytostase (vergleiche Abb. 3.14 L mit M und N).

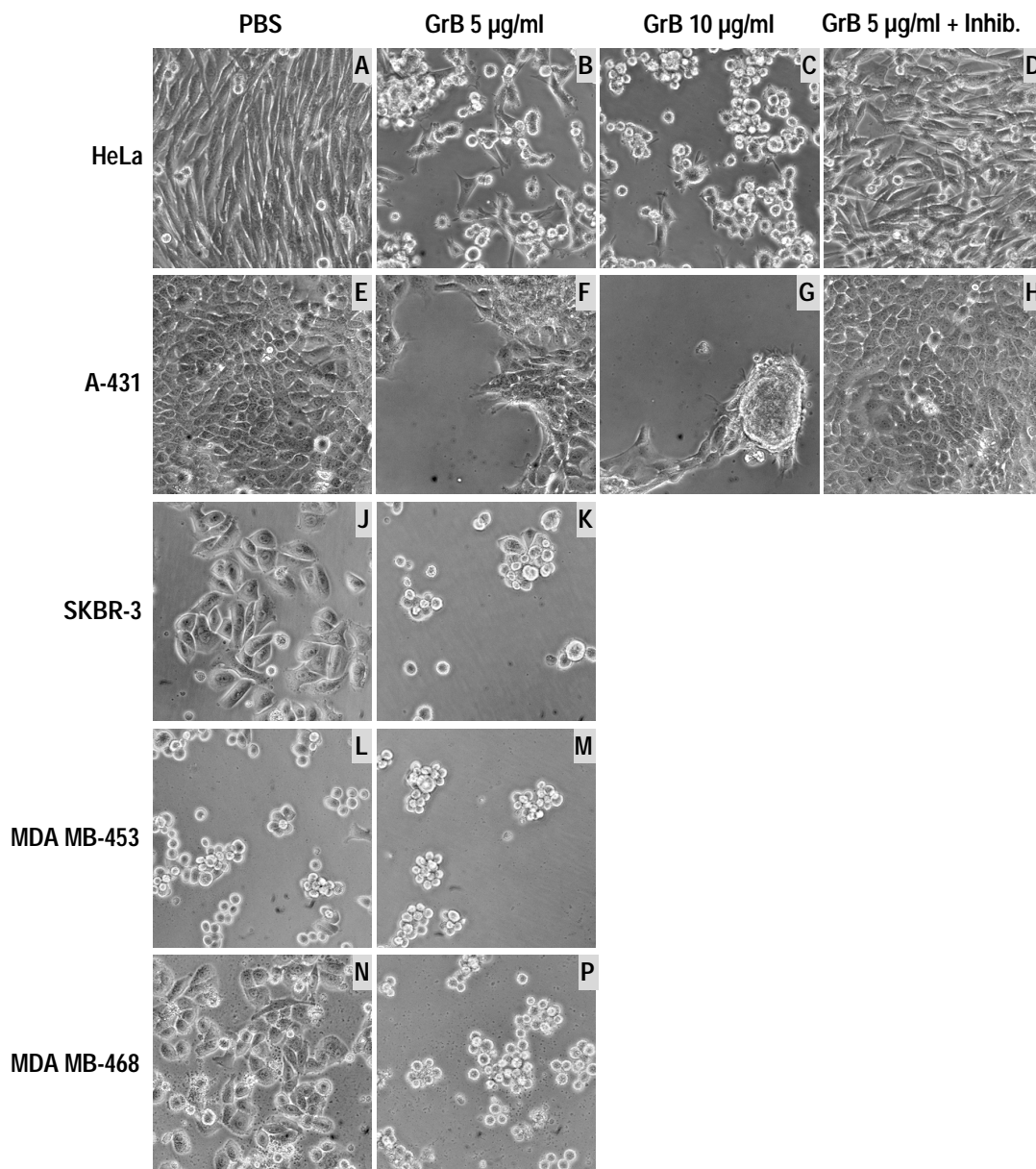




**Abbildung 3.14 Morphologische Veränderungen von HeLa Zellen nach Behandlung mit Granzym B in Abhängigkeit der Konzentration, enzymatischen Aktivität und Zeit.**  $5 \times 10^3$  HeLa Zellen in  $50 \mu\text{l}$  wurden zusammen mit  $50 \mu\text{l}$  Proteinlösung, die die angegebenen Konzentrationen Granzym B oder GrB S183A bzw. PBS oder  $1 \mu\text{M}$  Staurosporin anstelle von Protein enthielt, in einer 96 well Gewebekulturplatte ausgesät. Nach 20 Stunden und 5 Tagen wurden die Zellen zur Analyse der Morphologie fotografiert.

#### ***Untersuchung des Effekts von Granzym B auf verschiedene Zelllinien***

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob der Effekt, den rekombinantes Granzym B in höheren Konzentrationen und bei langen Inkubationszeiten auf die Morphologie von HeLa Zellen ausübt, unabhängig von der Zelllinie ist. Die in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Daten zeigen einen zytotoxischen Effekt von Granzym B auf Kulturen verschiedener adhärenter Tumorzelllinien. Diese Zellen wurden daher ebenfalls mit  $5 \mu\text{g/ml}$  Granzym B für zwei Tage behandelt und zur Analyse der Morphologie fotografiert; die Bilder sind in Abbildung 3.15



**Abbildung 3.15 Untersuchung des Effekts von Granzym B auf Kulturen verschiedener etablierter Tumorzelllinien.** Die angegebenen Tumorzelllinien wurden wie zuvor mit je 5 µg/ml Granzym B oder PBS für 2 Tage behandelt und fotografiert (A,B,E,F,J-P). Für HeLa und A-431 Zellen wurde darüber hinaus die Morphologie nach Behandlung mit 10 µg/ml Granzym B analysiert (C,G). Zum Nachweis, daß der beobachtete Effekt spezifisch durch die enzymatische Aktivität von Granzym B hervorgerufen wird, wurden HeLa und A-431 Zellen mit dem Aldehyd-Peptid-Inhibitor Ac-IETD-CHO (100 µM) für 30 min. bei Raumtemperatur vor Zugabe von 5 µg/ml Granzym B inkubiert und nach 2 Tagen fotografiert (D,H).

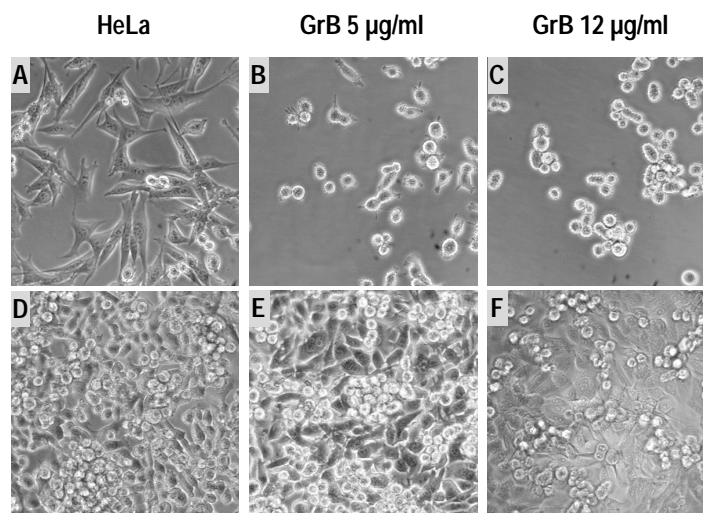
dargestellt. Wie HeLa Zellen lösen sich auch SKBR-3, MDA-MD 453 und MDA-MB 468 partiell von der Kulturschale ab und bilden Klumpen kugeliger Zellen, die nur noch locker, aber nach wie vor an der Schale angeheftet sind (Abb. 3.15 B,K,M,N im Vergleich zu A,J,L,P). Kulturen von A-431 Zellen bilden ebenfalls Zellklumpen, die dazwischenliegenden Zellen haben jedoch nach wie vor ihre ausgestreckte Morphologie und adhären normal an die Kulturschale (Abb. F). Wie bei HeLa Zellen ist der Effekt auch für A-431 Zellen ausgeprägter bei einer Granzym B-Konzentration von 10 µg/ml im Vergleich zu 5 µg/ml

(Abb. 3.15 C,G).

Mithilfe des Granzym B-spezifischen Aldehyd-Peptid-Inhibitors Ac-IETD-CHO wurde wie zuvor mit der inaktiven Mutante GrB S183A nachgewiesen, daß die morphologischen Veränderungen von der enzymatischen Aktivität von Granzym B abhängig sind. Durch Vorinkubation von HeLa wie auch A-431 Zellen mit dem Inhibitor für 30 Minuten bei Raumtemperatur konnte die normale Zellmorphologie vollständig erhalten werden (Abb. 3.15 D,H).

***Die morphologischen Veränderungen sind reversibel nach Entfernen von Granzym B: extrazellulärer Effekt von Granzym B***

Wie in Abbildung 3.14 gezeigt, behalten Zellkulturen bei andauernder Inkubation mit Granzym B über mehrere Tage die kugelige Morphologie bei und proliferieren offensichtlich nicht mehr. Dieser Effekt ist jedoch reversibel und kann durch Entfernen von Granzym B aufgehoben werden. HeLa Zellen wurden dazu wie in den vorausgegangenen Experimenten über Nacht mit Granzym B in Konzentrationen von 5 und 12 µg/ml behandelt. Die Zellen, die sich wie in Abb. 3.16 B und C von der Kulturschale abkugelten, wurden hier jedoch durch Auf- und Abpipettieren vollständig abgelöst. Granzym B wurde durch Zentrifugation entfernt, die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in neue Wells ausgesät. Bereits nach sehr kurzer Zeit (30 Minuten, nicht gezeigt) hatten die Zellen sich wieder an die Kulturschale angeheftet und waren in ihrer Morphologie von Kontrollzellen, die ohne weitere Behandlung in den ursprünglichen Wells kultiviert wurden, nicht zu unterscheiden. In den Abbildungen 3.16 E und F sind Bilder der Zellen drei Stunden nach Entfernen von Granzym B dargestellt.



**Abbildung 3.16 Die normale Zellmorphologie ist durch Entfernen von Granzym B rekonstituierbar.** A-C, Unbehandelte HeLa Zellen bzw. Zellen nach über-Nacht Behandlung mit Granzym B. D-F, HeLa Zellen wurden wie zuvor mit Granzym B über Nacht inkubiert, durch Auf- und Abpipettieren von der Kulturschale abgelöst, durch Zentrifugation pelletiert, in frischem Medium resuspendiert und in neue Wells ausgesät. Nach 3 Stunden wurden die Zellen fotografiert. Unbehandelte Kontrollzellen wurden in dem ursprünglichen Well belassen und ohne Behandlung weiterkultiviert.

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, daß die Fähigkeit der Zellen, sich an das Kultursubstrat

anzuheften, auch nach Einwirken von Granzym B erhalten bleibt. Im Gegensatz zur irreversiblen Proteolyse von intrazellulären Substraten durch Granzym B, die mit der Initiierung des apoptotischen Zelltod-Programms verbunden ist, deuten diese Daten daher darauf hin, daß Granzym B extrazellulär auf die Zellen einwirkt und möglicherweise die Ausbildung der extrazellulären Matrix zur Herstellung des Zell-Substrat-Kontakts beeinflusst.

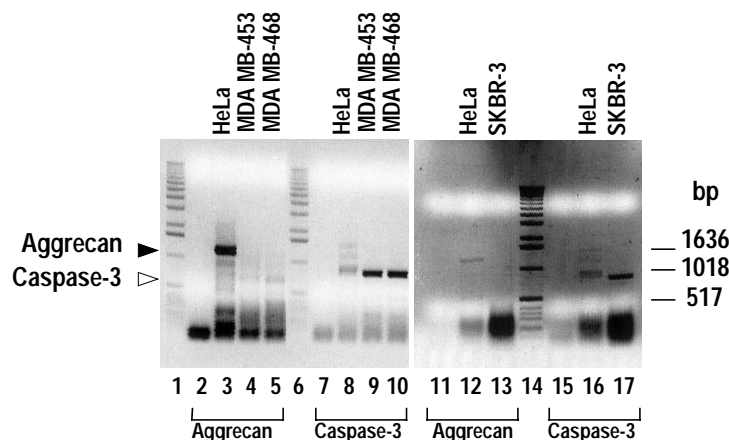
### **3.2.6 Untersuchung der Expression von Aggrecan als einem möglichen Zielprotein von Granzym B in der extrazellulären Matrix von Zellen**

Neben der Induktion von Apoptose durch Granzym B über den „klassischen“ Granzym B/ Perforin-Weg, der in der Einleitung unter 1.3 beschrieben wurde, konnte beobachtet werden, daß Granzym B auch eine Rolle bei rheumatoider Arthritis spielt [Ronday, 2001; Froelich, 1993]. Das Proteoglycan Aggrecan, das den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen bildet, wird durch Granzym B an verschiedenen Stellen unter Bildung von niedermolekularen Fragmenten gespalten [Froelich, 1993], was zum Abbau der Knorpelsubstanz beiträgt. Die in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebenen morphologischen Veränderungen, die in Kulturen adhärenter Tumorzellen nach Behandlung mit Granzym B beobachtet werden können, deuten darauf hin, daß Granzym B hier ebenfalls auf die extrazelluläre Matrix der Zellen einwirkt und so ein Anheften der Zellen an die Kulturschale verhindert. Die prinzipielle Fähigkeit der Zellen zur Anheftung an das Kultursubstrat bleibt jedoch wie im vorigen Kapitel gezeigt zumindest im Fall von HeLa Zellen erhalten. Diese Beobachtung deutet ebenfalls stark darauf hin, daß Granzym B proteolytisch die Ausbildung der extrazellulären Matrix verhindert, nicht jedoch die Zellen selber direkt schädigt.

Als ein erster Anhaltspunkt zur Klärung der Frage, ob der beobachtete Effekt von Granzym B auf die Morphologie adhärenter Zellen wie im Fall der rheumatoiden Arthritis auf das Einwirken der Protease auf die extrazelluläre Matrix der Zellen zurückgeführt werden kann, wurde untersucht, ob die hier verwendeten Tumorzelllinien Aggrecan als Bestandteil ihrer extrazellulären Matrix und mögliches Zielprotein von Granzym B exprimieren. Da kein anti-Aggrecan Antikörper zur Verfügung stand, wurde die Expression von Aggrecan anhand der mRNA untersucht. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Kulturen von HeLa, SKBR-3, MDA-MB 453, MDA-MB 468 und A-431 (nicht gezeigt) Zellen hergestellt. Diese wurde als template in einer RT-PCR und anschließender PCR mit Aggrecan-spezifischen primern eingesetzt. Die primer wurden so gewählt, daß ein 1178 bp Fragment des 5' Bereichs der Aggrecan cDNA, deren vollständige Länge 7137 bp beträgt, amplifiziert wird. Als Positivkontrolle für die Qualität der Gesamt-RNA wurde mit Caspase-3-spezifischen primern die vollständige cDNA (865 bp) von Caspase-3 amplifiziert. Während aus der Gesamt-RNA von HeLa Zellen das Aggrecan-spezifische DNA-Fragment amplifiziert werden konnte, ergab die RT-PCR an Gesamt-RNA aller übrigen untersuchten Zelllinien kein spezifisches Produkt. Die Caspase-3-spezifischen primer lieferten dagegen für alle Zelllinien das erwartete cDNA-Fragment. In den Ansätzen der verschiedenen Zelllinien war darüber hinaus jeweils etwa die gleiche Menge Gesamt-RNA vorhanden (nicht gezeigt).

HeLa Zellen enthalten damit als einzige der untersuchten Zelllinien Aggrecan mRNA und daher wahrscheinlich auch Aggrecan Protein, das als ein mögliches Zielprotein in der extrazellulären Matrix von Granzym B angegriffen werden könnte. Da jedoch alle untersuchten Zelllinien nach Einwirken von Granzym B deutliche Veränderungen ihrer Morphologie zeigen, ist davon auszugehen, daß Granzym B weitere Bestandteile der extrazellulären Matrix

oder an ihrem Aufbau beteiligte Proteine spaltet. Die Identifizierung von möglichen Substratproteinen konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen werden.



**Abbildung 3.17 RT-PCR an Gesamt-RNA verschiedener Tumorzelllinien zum Nachweis von AggreCAN mRNA.** Wie in Material und Methoden beschrieben, wurde aus Kulturen verschiedener Tumorzelllinien Gesamt-RNA präpariert und diese als RNA template in einer RT-PCR und anschließender PCR mit AggreCAN-spezifischen primern eingesetzt. Als Kontrolle für die Qualität der Gesamt-RNA wurde die RT-PCR ebenfalls mit Caspase-3-spezifischen primern durchgeführt. Amplifiziert wurde ein 1178 bp DNA-Fragment der gesamten AggreCAN cDNA (7137 bp); mit den Caspase-3-spezifischen primern wurde ein 865 bp Fragment entsprechend der vollständigen cDNA-Sequenz von Caspase-3 amplifiziert.

### 3.2.7 Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.6

Rekombinantes Granzym B, das in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert wurde, ist in der Lage, nach Einschleusen in Zielzellen mithilfe des BioPORTER Transduktionsreagens apoptotischen Zelltod und DNA-Fragmentierung zu induzieren. Die bakteriellen porenbildenden Toxine  $\alpha$ -Hämolysin und Cytolysin A konnten dagegen die Funktion von Perforin nicht ersetzen, das als physiologisches Agens Granzym B Zugang zu Substratproteinen im Zytoplasma oder Zellkern von Zielzellen gewährt und das zusammen mit Granzym B für die Initiierung von Apoptose notwendig ist. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, daß Granzym B bei Konzentrationen ab ca. 5  $\mu$ g/ml in Abwesenheit von Perforin bei Inkubationszeiträumen von ein bis zwei Tagen einen zytotoxischen Effekt auf Kulturen etablierter Tumorzelllinien ausübt. Mit DNA-Fragmentierung, Kondensation und Fragmentierung des Zellkerns sowie Spaltung von Caspase-3 konnten in diesen Zellen Merkmale von Apoptose nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden auffallende morphologische Veränderungen nach Behandlung mit Granzym B beobachtet, die zum partiellen Verlust der Anheftung adhärenter Zellen an die Kulturschale führen. Dieser Effekt wird durch die enzymatische Aktivität von Granzym B hervorgerufen und ist nach Entfernen der Protease reversibel, was im Gegensatz zur Granzym B/Perforin-induzierten Apoptose auf einen extrazellulären Effekt von Granzym B hindeutet.

Das Proteoglycan AggreCAN, das den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen bildet, wurde in der Literatur als ein extrazelluläres Substrat von Granzym B beschrieben. Über RT-PCR konnte AggreCAN mRNA in HeLa Zellen nachgewiesen werden,

nicht jedoch in den übrigen untersuchten Zelllinien. Die Tatsache, daß sich diese Zellen gleichermaßen durch Granzym B-Einwirkung von der Kulturschale ablösen, weist daher auf die Existenz weiterer extrazellulärer Substrate für Granzym B hin, die in weiterführenden Arbeiten zu identifizieren wären.

### **3.3 Konstruktion und Charakterisierung von Granzym B-Fusionsproteinen zur Aufnahme in Tumorzellen**

Nachdem wie unter 3.1 beschrieben mit der Hefe *Pichia pastoris* ein geeignetes Expressionssystem gefunden worden war, das die Herstellung von enzymatisch aktivem, rekombinantem Granzym B erlaubt, wurde untersucht, ob rekombinante Formen von Granzym B für therapeutische Zwecke zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen herangezogen werden können. Dabei wurde zunächst davon ausgegangen, wie es Stand der Literatur zu Beginn der Arbeit war, daß Granzym B ohne Perforin oder ein anderes endosomolytisches Agens nicht in der Lage ist, in Zielzellen einzudringen. Die später in der Literatur beschriebene Beobachtung, daß Granzym B unabhängig von Perforin in Zellen eindringen kann, aber inaktiv in einem nicht näher charakterisierten Membrankompartiment bleibt [Pinkoski, 1998; Froelich, 1996b], ließ nach wie vor unklar, über welchen Weg Granzym B in die Zellen gelangt und ob es eine eigene Zellbindungsdomäne besitzt. Strategien zur Verwendung von Granzym B als potentiell Tumor-Therapeutikum zielten daher einerseits darauf, das rekombinante Protein in Zielzellen einzuschleusen und der Protease so Zugang zu ihren Substraten zu gewähren, deren Spaltung apoptotischen Zelltod induziert. Andererseits war für einen möglichen therapeutischen Einsatz von Granzym B der Aspekt der Zellspezifität zu berücksichtigen, d.h. das gezielte Einschleusen der Protease in Tumorzellen, um eine Schädigung von nicht-malignem Gewebe zu vermeiden. Das Konzept war dabei, Granzym B durch Fusion mit einem „single chain“ Antikörperfragment mit Tumorzell-spezifischer Zellbindungsaktivität auszustatten und so zu ermöglichen, daß die Protease über den endosomalen Weg in Zellen aufgenommen werden kann. Die prinzipielle Klärung der Frage, ob Granzym B-Fusionsproteine unter Erhalt der enzymatischen Aktivität von Granzym B hergestellt werden können, d.h. ob Granzym B grundsätzlich als Effektorfunktion in solchen therapeutischen Ansätzen eingesetzt werden kann, war darüber hinaus ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

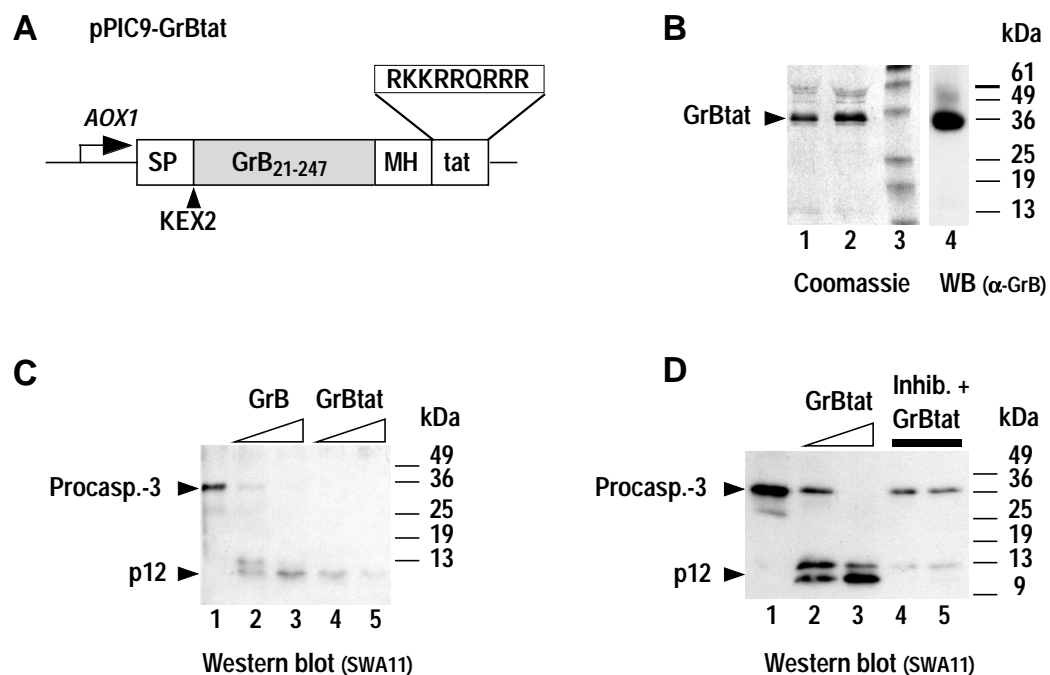
#### **3.3.1 Expression und funktionelle Charakterisierung von Granzym B-tat zur intrazellulären Aufnahme von Granzym B und Akkumulierung im Zellkern**

Während lange Zeit nicht bekannt war, über welchen Mechanismus Granzym B in Zellen eindringt, beschrieben verschiedene Veröffentlichungen die durch Perforin vermittelte Relokalisation von Granzym B aus zytoplasmatischen Vesikeln in den Zellkern von Zielzellen, wo es akkumuliert und verschiedene Substratproteine spaltet [Jans, 1996; Pinkoski, 1996; Trapani, 1996; Trapani, 1998]. Es wurde daher untersucht, ob durch Anfügen eines Kernlokalisationssignals an die Sequenz von Granzym B die Protease auf diese Weise ebenfalls in den Zellkern dirigiert werden kann und ob dies zur Induktion von Apoptose ohne Perforin führt (3.3.1). Als

Kernlokalisierungssignal wurde die entsprechende Sequenz des HIV Tat Proteins verwendet, die auch als „protein transduction domain“ beschrieben und zur unspezifischen Aufnahme heterologer Proteine in Zellen eingesetzt wird [Efthymiadis, 1998; Nagahara, 1998; Schwarze, 1999]. Die Fusion mit dieser Signalsequenz sollte daher gleichzeitig die (wenn auch unspezifische) Aufnahme von Granzym B in Zellen erlauben.

### Konstruktion und Expression von GrB-tat in der Hefe *Pichia pastoris*

Durch Insertion eines Oligonukleotids, das für die Aminosäuresequenz des Kernlokalisierungssignals (NLS) des HIV Tat Proteins kodiert (vgl. 2.1.5 tat-NLS sense und antisense) in den 3' Polylinkerbereich des *Pichia* Expressionsvektors pPIC9Δ[GrBmh] wurde das Plasmid pPIC9[GrB-tat] erhalten (Abb. 3.18 A). Dieses Konstrukt, das durch Sequenzierung verifiziert wurde, erlaubt die Methanol-induzierbare Expression von Granzym B mit C-terminalem Myc- und Hexahistidin-tag sowie dem Tat NLS-Signalpeptid in der Hefe *Pichia pastoris*.



**Abbildung 3.18 Expression und Untersuchung der enzymatischen Aktivität von Granzym B-tat.** **A, Expressionskonstrukt zur Expression in *Pichia pastoris*.** Das Expressionsplasmid pPIC9[GrB-tat] wurde von pPIC9Δ[GrBmh] durch Insertion eines Oligonukleotids, das für die Aminosäuresequenz des NLS des HIV Tat Proteins kodiert, in den 3' Bereich der Polylinkersequenz abgeleitet. **B, Coomassie gefärbtes SDS-Gel und anti-Granzym B Western blot von gereinigtem GrB-tat.** Das Protein wurde aus dem Überstand einer *Pichia* Expressionskultur über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Spuren 1, 2 und 4 enthielten 1, 2 und 4 µg GrB-tat, Spur 3: Markerproteine. **C, D, Nachweis der enzymatischen Aktivität.** **C,** 10 und 50 ng gereinigtes Granzym B oder GrB-tat (entspr. 6,25 und 31,25 nM) wurden zum Nachweis und Vergleich der enzymatischen Aktivitäten mit je 100 ng rekombinanter Procaspase-3 bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Spaltung von Caspase-3 wurde anhand der Freisetzung der p12 Caspase-3 Untereinheit im Western blot nachgewiesen. **D, Die Spaltung von Procaspase-3 durch GrB-tat kann mit dem spezifischen GrB-Inhibitor Ac-IETD-CHO verhindert werden.** Die Ansätze 2, 4 und 5 enthielten je 10 ng GrB-tat entspr. 6,25 nM, Ansatz 3 enthielt 50 ng GrB-tat entspr. 31,25 nM. Vor Zugabe von Procaspase-3 zu den Spaltansätzen wurden die Ansätze 4 und 5 mit 1 mM bzw. 100 µM Ac-IETD-CHO für 20 min. auf Eis vorinkubiert.

Das rekombinante Protein konnte in *Pichia* Kulturen, die das Konstrukt stabil in das Hefegenom integriert hatten, exprimiert und aufgrund des Signalpeptids (SP) des  $\alpha$ -Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* in das Kulturmedium sekretiert werden. Aus dem Überstand von Expressionskulturen wurde das native Protein über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie in Ausbeuten vergleichbar denen von nicht-modifiziertem Granzym B von ca. 1-2 mg je Liter Expressionskultur gereinigt. Abbildung 3.18 B zeigt das gereinigte Protein nach SDS-PAGE und Coomassie Färbung bzw. Western blot, der mit monoklonalem anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) entwickelt wurde. GrB-tat hat wie nicht-modifiziertes Granzym B eine molare Masse von ca. 36 kDa.

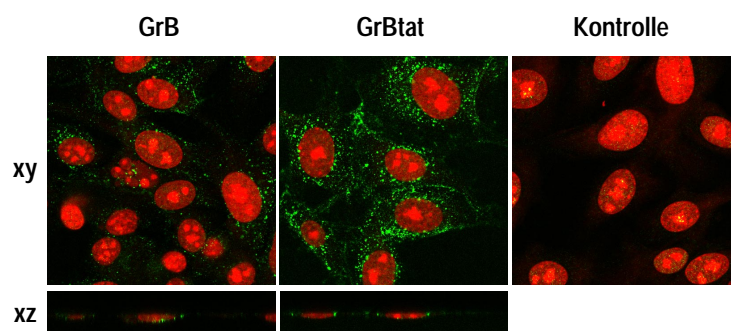
### Analyse der enzymatischen Aktivität von GrB-tat

Die enzymatische Aktivität von gereinigtem GrB-tat wurde anhand der Spaltung von Caspase-3 im Vergleich zu nicht-modifiziertem Granzym B bestimmt. Jeweils gleiche Mengen Granzym B und GrB-tat wurden dazu mit rekombinanter Procaspase-3 wie unter 2.2.3.12 beschrieben inkubiert. Die Spaltung wurde über die Freisetzung der p12 Caspase-3 Untereinheit detektiert. Wie in Abb. 3.18 C gezeigt ist, konnte kein Unterschied beider Proteine hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Spaltung von Caspase-3 festgestellt werden.

Wie zuvor für rekombinantes Granzym B wurde auch für GrB-tat die Hemmbarkeit der Spaltung von Caspase-3 durch den Granzym B-spezifischen Peptid-Inhibitor Ac-IETD-CHO untersucht. Durch Vorinkubation von GrB-tat mit 100  $\mu\text{M}$  Inhibitor konnte die Spaltung von Caspase-3 fast vollständig gehemmt werden (Abb. 3.18 D Spur 5 im Vergleich zu Spur 2).

### Intrazelluläre Lokalisation von GrB-tat im Vergleich zu GrB

Über Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser Scanning Mikroskopie wurde untersucht, ob GrB-tat in Zellen eindringen kann und sich im Zellkern anreichert. Dazu wurden HeLa Zellen für 90 min. mit GrB-tat oder GrB behandelt. Die Lokalisation von Granzym B oder GrB-tat wurde anschließend durch Anfärben der Zellen mit anti-Granzym B Antikörper und anti-Maus-Alexa488 Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper bestimmt. Wie bereits unter 3.2.4 beschrieben wurde, ist nicht-modifiziertes Granzym B deutlich in den Zellen zu erkennen und lokalisiert offensichtlich in vesikulären Strukturen im Zytoplasma (Abb. 3.19).



**Abbildung 3.19 Nachweis der intrazellulären Lokalisation von GrB-tat und Granzym B.** HeLa Zellen wurden mit 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Protein oder PBS für 90 min. bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, fixiert und mit anti-Granzym B-Antikörper (Santa Cruz) und Alexa488-markiertem Zweitantikörper (grün) angefärbt. Die zelluläre Lokalisation von GrB-tat bzw. GrB wurde über CLSM analysiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt.



Im Vergleich zu der Aufnahme von GrB ist jedoch für GrB-tat kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Wie GrB wird auch GrB-tat in vesikulären Strukturen ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. Es konnte dagegen kein GrB-tat im Zellkern detektiert werden. Als Ursache läßt sich vermuten, daß die hochaffine Bindung von Granzym B an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor oder die sehr schnelle Aufnahme über einen alternativen Weg bevorzugt vor einer eventuellen Transduktion vermittelt durch die tat-Signalsequenz erfolgt. Aus den endosomalen Vesikeln ist eine Translokation von Granzym B durch das NLS-Signalpeptid in den Zellkern offensichtlich nicht möglich. Im Vergleich zu Granzym B konnte ebenfalls keine erhöhte zytotoxische Aktivität von GrB-tat gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien beobachtet werden (nicht gezeigt).

### **Zusammenfassung**

GrB-tat, das in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert und aus Überständen von Expressionskulturen gereinigt wurde, ist wie rekombinantes Granzym B hochaktiv gegenüber Caspase-3 als physiologischem Substrat. Die Spaltung von Caspase-3 ist spezifisch und hemmbar durch den Granzym B Inhibitor Ac-IETD-CHO. Die Fusion der tat-NLS-Sequenz an den C-Terminus von Granzym B führte damit nicht zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Die tat-Signalsequenz vermittelt aber weder die Transduktion von GrB-tat in das Zytoplasma von Zellen noch die Translokation des rekombinanten Proteins in den Zellkern, was wahrscheinlich auf die bevorzugte, sehr schnelle Aufnahme von Granzym B in die Zellen in Membransumgeschlossene Vesikel über einen Granzym B-spezifischen Mechanismus zurückzuführen ist.

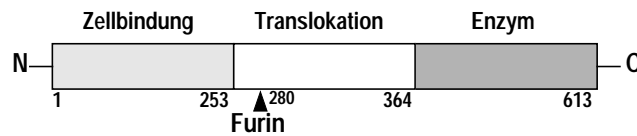
### **3.3.2 Konstruktion von Granzym B-Fusionsproteinen mit „single chain“ Antikörper und bakterieller Translokationsdomäne zur gezielten Aufnahme in Tumorzellen**

In therapeutischen Ansätzen zur spezifischen Eliminierung von transformierten Zellen wurden in der Vergangenheit wie in der Einleitung unter 1.4.2 beschrieben von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Immuntoxine hergestellt, die im Wesentlichen von den bakteriellen Toxinen Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* sowie Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* abgeleitet sind [Frankel, 2000; Kreitman, 1999]. Die Domänenstruktur beider Toxine ist in Abb. 3.20 A schematisch dargestellt. Beide Toxine bestehen aus drei funktionellen Domänen, die für Zellbindung, Translokation aus dem Endosom ins Zytoplasma und zytotoxische Aktivität verantwortlich sind [Drazin, 1971; Hwang, 1987]. Über die Zellbindungsdomäne binden diese Toxine an eine Zielzelle und werden über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Während der Aufnahme erfolgt die Abspaltung der Zellbindungsdomäne durch die lysosomale Protease Furin [Gordon, 1995]. Im Endosom bewirkt das leicht saure Milieu darüber hinaus eine Konformationsänderung in der Translokationsdomäne, die zur Insertion in die Endosomen-Membran und zum Membrandurchtritt der katalytischen Domäne in das Zytoplasma führt. Dort löst schließlich die enzymatische Aktivität der toxischen Domäne durch ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor 2 und Inhibierung der Proteinbiosynthese den Zelltod aus [Morimoto, 1992].

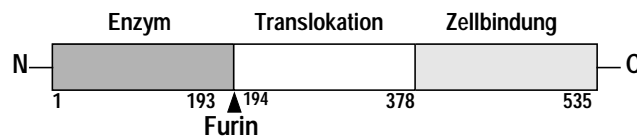
Die enorme Toxizität dieser Moleküle (es wird angenommen, daß ein einziges Molekül pro Zelle ausreicht, um eine Zelle abzutöten) wird in Form von Immuntoxinen für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht. Die Zellbindungsdomäne des Toxins ist in Immuntoxinen gegen einen Antikörper oder ein Antikörperfragment ausgetauscht, was erlaubt, die zytotoxische

Aktivität gezielt gegen Zellen zu richten, die ein vom Antikörper erkanntes spezifisches Zelloberflächenmolekül exprimieren.

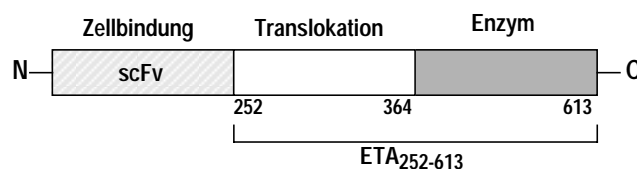
### A Exotoxin A (ETA)



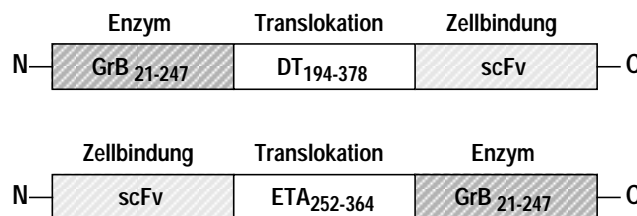
### Diphtherietoxin (DT)



### B Immuntoxine: scFv(FRP5)-ETA<sub>252-613</sub>



### C GrB-Konstrukte



**Abbildung 3.20 Konstruktion neuer, Immuntoxin-ähnlicher Fusionsproteine.** **A**, Untereinheitenstruktur der bakteriellen Toxine Exotoxin A und Diphtherie-Toxin. **B**, Schematische Darstellung des Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA, das von Exotoxin A abgeleitet wurde. **C**, Theoretisch denkbare Konstrukte für Immuntoxin-ähnliche Granzym B-Fusionsproteine, die von Exotoxin A oder Diphtherie-Toxin abgeleitet sind. Einzelheiten zu A-C sind im Text erläutert.

In unserer Arbeitsgruppe wurde das Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA (5-ETA) entwickelt, das von Exotoxin A (ETA) abgeleitet ist und als Zellbindungsdomäne den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 neben den Domänen II und III von Exotoxin A enthält [Wels, 1992] (Abb. 3.20 B). Im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern, die unter Verwendung klassischer Hybridomverfahren gewonnen werden und meist murinen Ursprungs sind, enthalten sogenannte einkettige Antikörper-Fv-Fragmente („single chain antibodies“ scFv) nur die variablen Domänen der schweren und leichten Kette eines monoklonalen Antikörpers und werden durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt: Ausgehend von der cDNA der Hybridomzelllinie, die den zugrundeliegenden monoklonalen Antikörper produziert, werden

die variablen Regionen der schweren und leichten Kette über PCR amplifiziert und in geeignete Expressionsvektoren so kloniert, daß beide Domänen über einen Glycin-Serin-Linker (GGGGS)<sub>3</sub> verbunden sind. Während monoklonale Antikörper eine molare Masse von etwa 150 bis 180 kDa besitzen, sind „single chain“ Antikörper mit einer molaren Masse von ca. 27 kDa wesentlich kleiner und daher bei etwa gleicher Antigenbindungsfähigkeit [Wels, 1995] für therapeutische Anwendungen in rekombinanten Fusionsproteinen wesentlich besser geeignet. Da die Immunogenität monoklonaler Antikörper v. a. durch die konstanten Bereiche vermittelt wird, die in „single chain“ Antikörpern nicht mehr vorhanden sind, ist die Gefahr einer gegen den Mausantikörper gerichteten Immunreaktion bei wiederholter therapeutischer Verabreichung im Fall von „single chain“ Antikörpern ebenfalls deutlich reduziert. Der Wachstumsfaktor-Rezeptor ErbB2, der zur Familie der EGF-Rezeptoren gehört, ist auf einer Vielzahl von Tumoren epithelialen Ursprungs stark überexprimiert und stellt daher ein geeignetes Tumorantigen als Angriffspunkt Antikörper-basierender Therapien dar.

5-ETA besitzt sehr hohe toxische Aktivität gegenüber ErbB2-exprimierenden Tumorzellen *in vitro* und *in vivo*. Sowohl im Mausmodell [Azemar, 2000; Maurer-Gebhard, 1998] als auch in Heilversuchen mit einzelnen Patienten (W. Wels, pers. Mitteilung) konnten therapeutische Erfolge mit 5-ETA erzielt werden. Der Einsatz von Immuntoxinen für therapeutische Zwecke wird jedoch durch die Produktion neutralisierender Antikörper im Patienten limitiert, die darauf zurückzuführen ist, daß der Toxinanteil des Moleküls bakteriellen Ursprungs und damit immunogen im menschlichen Organismus ist. Die Patientendaten bestätigen in der Praxis diese theoretische Limitierung des Einsatzes von Immuntoxinen (W. Wels, pers. Mitteilung).

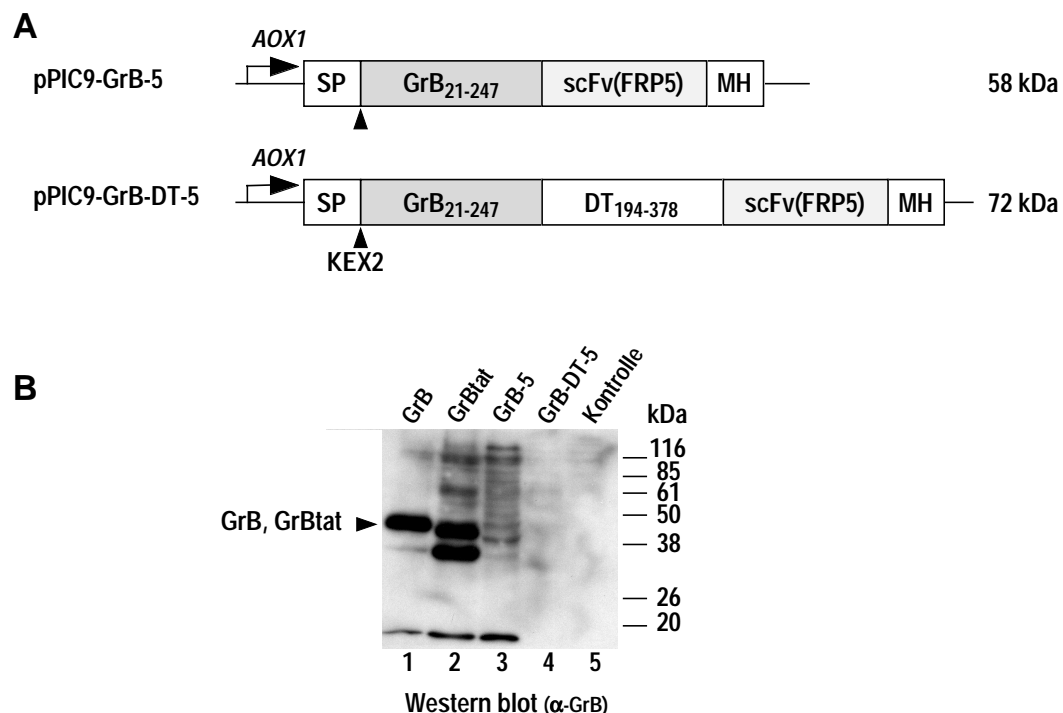
Der Ersatz der Enzym-Domäne des Toxins durch Granzym B (oder aktive Caspase-3, siehe 3.4) als eine vergleichbare enzymatische Aktivität humanen Ursprungs könnte zu neuartigen Fusionsproteinen führen, die als „humanisierte“ Immuntoxine betrachtet werden können. Theoretisch denkbare Konstrukte, die von Exotoxin A und Diphtherie-Toxin abgeleitet sind und Granzym B anstelle der bakteriellen Toxindomäne neben einem „single chain“ Antikörper und der bakteriellen Translokationsdomäne enthalten, sind in Abb. 3.20 C dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden solche Proteine konstruiert. Die besondere Schwierigkeit bestand dabei darin, nach Fusion mit heterologen Proteindomänen die enzymatische Aktivität von Granzym B zu erhalten. Wie bereits unter 3.1.2 ausgeführt wurde, ist für die Aktivität der reifen Protease wahrscheinlich ein freier, definierter N-Terminus notwendig; im vorigen Abschnitt (3.3.1) konnte dagegen gezeigt werden, daß die Fusion heterologer Peptidsequenzen an den C-Terminus von Granzym B nicht zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt. Die im Folgenden beschriebenen Granzym B-Fusionsproteine basieren daher auf dem zweiten in Abb. 3.20 C dargestellten Konstrukt und wurden unter Verwendung der Translokationsdomäne von Diphtherie-Toxin synthetisiert.

### 3.3.3 Expression von GrB-DT-scFv(FRP5) und GrB-scFv(FRP5) in der Hefe *Pichia pastoris*

Da enzymatisch aktives Granzym B in *Pichia pastoris* exprimiert werden konnte (3.1.8), wurden Granzym B-Antikörper Fusionsproteine zunächst ebenfalls zur Expression in der Hefe konstruiert. Wie im vorigen Abschnitt bereits theoretisch dargestellt, wurde ein Fusionsprotein von Diphtherie-Toxin abgeleitet, das neben Granzym B die Translokationsdomäne

von Diphtherie-Toxin und den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 enthält und als GrB-DT-5 bezeichnet wird. Der entsprechende Expressionsvektor pPIC9Δ[GrB-DT-5mh] enthält die als PCR-Produkt bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C mit XhoI und NheI Schnittstellen synthetisierte cDNA von reifem Granzym B, die in einer Tripelligation mit einem NheI, NotI-Fragment kodierend für die Translokationsdomäne von Diphtherie-Toxin und den „single chain“ Antikörper FRP5 in die XhoI und NotI sites von pPIC9 inseriert wurde. Darüber hinaus wurde ein zweites Granzym B-Fusionsprotein GrB-5 konstruiert, das keine Translokationsdomäne, sondern nur den „single chain“ Antikörper FRP5 fusioniert an den C-Terminus von Granzym B enthält.



**Abbildung 3.21 Konstruktion und Expression von GrB-5 und GrB-DT-5 in der Hefe *Pichia pastoris*.** **A, Expressionskonstrukte.** Die Plasmide pPIC9Δ[GrB-5] und pPIC9Δ[GrB-DT-5] wurden von pPIC9Δ[GrBmh] wie unter Material und Methoden beschrieben abgeleitet. An den C-Terminus von Granzym B wurde die DNA-Sequenz kodierend für den „single chain“ Antikörper FRP5 bzw. die Translokationsdomäne von Diphtherie-Toxin und scFv(FRP5) fusioniert. Beide Konstrukte verfügen darüber hinaus über ein Myc-Epitop und Hexahistidin-tag (MH) sowie das Signalpeptid (SP) des α-Faktors aus *S. cerevisiae*, das die Sekretion der rekombinanten Proteine in den Kulturüberstand erlaubt und das während der Sekretion von der *Pichia* Protease KEX2 abgespalten wird. Die berechneten molaren Massen der Proteine betragen ohne Glykosylierung 58 und 72 kDa. **B, Expressionsanalyse in Überständen von *Pichia* Expressionskulturen.** Aliquots von Expressionskulturen, die aus stabil mit den entsprechenden Konstrukten transformierten *Pichia* Klonen herangezogen wurden, wurden im Western blot mit anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) analysiert. Als Positivkontrolle wurden Überstände vergleichbarer Kulturen, die GrB und GrB-tat exprimieren, sowie der Überstand einer Kultur, die mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert war (Kontrolle), aufgetragen.

Zur Klonierung von pPIC9Δ[GrB-5mh] wurde die cDNA von reifem Granzym B, die als PCR-Produkt mit XhoI und ClaI Schnittstellen bei einer Hybridisierungstemperatur von 58°C synthetisiert wurde, in einer Tripelligation zusammen mit einem ClaI, XbaI-Fragment

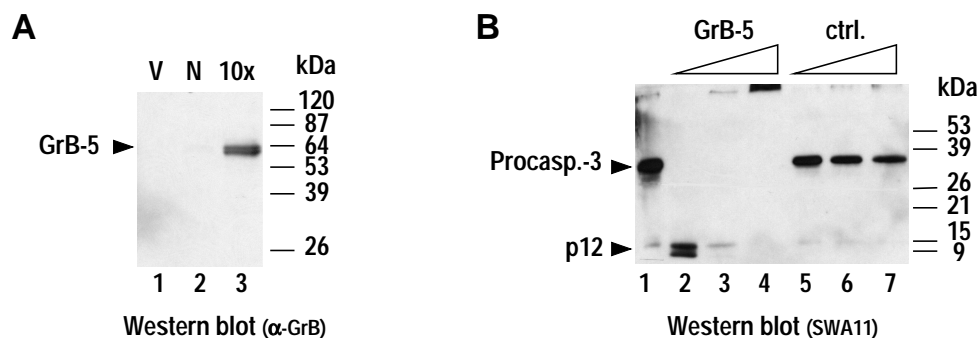
kodierend für den „single chain“ Antikörper FRP5 zunächst in die XhoI und XbaI sites von pBIKSmh inseriert. Das XhoI, NotI-Fragment aus dem resultierenden pBIKS[ΔGrB-5mh] wurde dann in die entsprechenden sites von pPIC9 subkloniert. Beide Konstrukte, die in Abbildung 3.21 A dargestellt sind, enthalten ein Myc-Epitop und Hexahistidin-tag (MH) sowie ein Signalpeptid (SP), das die Sekretion der rekombinanten Proteine in das Kulturmedium erlauben. Das Signalpeptid wird während der Sekretion durch die *Pichia* Protease KEX2 abgespalten. Durch Ansequenzierung von beiden Enden wurden die pPIC9-Konstrukte verifiziert.

Hefe-Klone, die nach Transformation die Konstrukte stabil in das *Pichia* Genom integriert hatten, wurden selektioniert und auf Expression und Sekretion der Proteine analysiert. Abbildung 3.21 B zeigt einen Western blot, der mit monoklonalem anti-Granzym B Antikörper entwickelt wurde. Es wurden jeweils gleiche Volumina von Überständen präparativer Expressionskulturen aufgetragen, die parallel unter vergleichbaren Bedingungen herangezogen wurden, und die mit pPIC9Δ[GrBmh], pPIC9Δ[GrB-tat], pPIC9Δ[GrB-5] oder pPIC9Δ[GrB-DT-5] transformiert waren. Die Kontroll-Kultur war mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert. Während Granzym B und GrB-tat wie bereits zuvor gezeigt mit hoher Ausbeute exprimiert wurden und deutliche Signale im Western blot hervorriefen, konnten keine nachweisbaren Mengen an GrB-5 und GrB-DT-5 hergestellt werden. Die Analyse verschiedener Klone wie auch die Variation der Expressionsbedingungen führten ebenfalls nicht zur Expression signifikanter Mengen an Fusionsprotein. In einigen Fällen wurde lediglich eine Proteinbande von ca. 35 kDa detektiert, die aufgrund ihrer Größe Granzym B ohne Translokationsdomäne und/oder „single chain“ Antikörper zugeordnet werden kann.

#### ***Enzymatische und Zellbindungsaktivität von GrB-scFv(FRP5) aus konzentrierten Pichia Kulturüberständen***

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Versuchen der Expression von GrB-5 konnte im Überstand der Kultur eines *Pichia* Klons, der mit pPIC9Δ[GrB-5] transformiert war, der aber aufgrund eines Klonierfehlers keinen Myc-his-tag enthielt, ein Protein der richtigen Größe nachgewiesen werden. In Abbildung 3.22 A ist der Western blot abgebildet, auf dem Aliquots der Kulturüberstände vor (V) und nach (N) Induktion der Proteinexpression analysiert wurden. Nach Ernte der Kultur wurden 2 ml des Überstands mit einem Centricon spin Konzentrador ca. zehnfach konzentriert und das Konzentrat ebenfalls im Western blot untersucht. Während im nicht-konzentrierten Überstand kein Protein mit dem Granzym B-spezifischen Antiserum, das in Mäusen hergestellt wurde (3.1.6), detektiert werden konnte, lieferte der konzentrierte Überstand eine Proteinbande von ca. 64 kDa. Dies stimmt mit der berechneten molaren Masse von 58 kDa für GrB-5 unter Berücksichtigung von Glykosylierung überein.

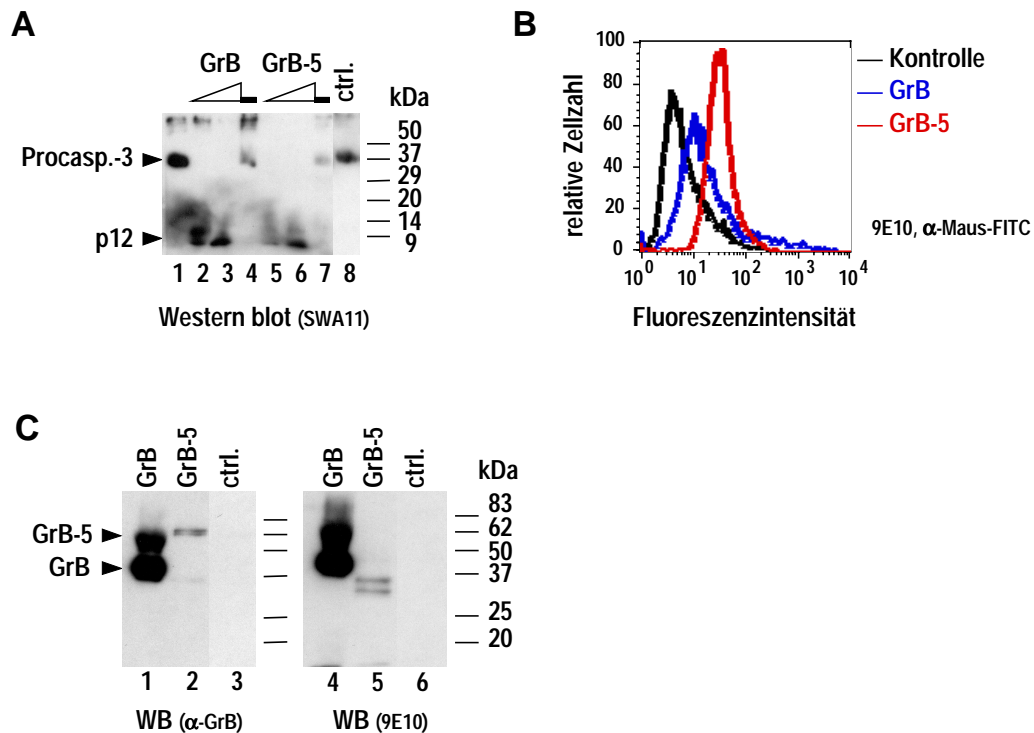
Dieser konzentrierte Kulturüberstand wurde zur Analyse der enzymatischen Aktivität mit Caspase-3 in einem Spaltassay (2.2.3.12) eingesetzt. Wie in Abbildung 3.22 B dargestellt ist, enthielt der Überstand Granzym B-Aktivität und führte zur Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 und Freisetzung der p12 Untereinheit, die im Western blot detektiert wurde. Als Kontrolle wurden gleiche Volumina der Durchflußfraktion der spin Konzentration eingesetzt. In späteren Experimenten wurde als weitere Kontrolle der konzentrierte Überstand einer *Pichia* Kultur, die mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert war, auf enzymatische Aktivität analysiert. Es konnte jedoch keine Spaltung von Caspase-3 beobachtet werden (nicht gezeigt bzw. Abb. 3.23 A Spur 8).



**Abbildung 3.22 Enzymatische Aktivität von GrB-5 im konzentrierten Überstand einer Expressionskultur.** **A, Nachweis von GrB-5 im Überstand einer Expressionskultur.** Western blot von Aliquots der Expressionskultur vor (V) und nach (N) Induktion der Proteinexpression sowie von zehnfach konzentriertem Überstand nach Ernte der Kultur. Der blot wurde mit murinem anti-Granzym B Antiserum (3.1.6) entwickelt. **B, Nachweis der enzymatischen Aktivität.** 1, 5 und 20 μl des zehnfach konzentrierten Kulturüberstands, der GrB-5 enthielt, wurde mit rekombinanter Caspase-3 inkubiert und Spaltung von Caspase-3 anhand der Freisetzung der p12 Untereinheit nachgewiesen. Die Kontrollansätze enthielten entsprechende Volumina der Durchflußfraktion des spin Konzentrators, der zum Konzentrieren verwendet wurde.

Der Nachweis enzymatischer Granzym B-Aktivität in diesem Kulturüberstand liefert einen wichtigen Hinweis darauf, daß neben kurzen Peptidsequenzen auch größere Proteindomänen am C-Terminus von Granzym B toleriert werden, ohne daß die Enzymaktivität verloren geht. Bei einer geschätzten Konzentration von maximal 1 nM GrB-5 in dem Caspase-3-Spaltansatz, der 1 μl Überstand enthielt, besitzt das rekombinante Fusionsprotein etwa vergleichbare Aktivität wie rekombinantes Granzym B, das bei einer Konzentration von ca. 3 nM zur vollständigen Spaltung von Caspase-3 in einer Konzentration von 74 nM führt. Allerdings konnte auch bei diesem Ansatz GrB-5 nur in sehr geringer Ausbeute von weniger als 250 μg GrB-5 je Liter Expressionskultur exprimiert werden. Die Reinigung dieses Proteins war jedoch nicht möglich, da das Konstrukt wie erwähnt keinen his-tag enthielt.

Da GrB-5 aber prinzipiell durch Reinigung aus dem Kulturüberstand konzentriert werden könnte, wurde der Überstand der Kultur eines zuvor untersuchten *Pichia* Klons, der das korrekte Konstrukt mit Myc-Epitop und Hexahistidin-tag enthielt, ebenfalls mit Centricon spin Konzentratoren ca. fünffach konzentriert und gleichfalls auf enzymatische Aktivität untersucht. Es konnte auch in diesem konzentrierten Kulturüberstand enzymatische Aktivität und Spaltung von Caspase-3 (Abb. 3.23 A Spuren 5 und 6) nachgewiesen werden, die mit dem Granzym B-spezifischen Peptidinhibitor Ac-IETD-CHO verhindert werden konnte (Spur 7). Ein gleichermaßen konzentrierter Überstand einer *Pichia* Kultur, die mit dem leeren pPIC9 transformiert war, führte dagegen nicht zur Spaltung von Caspase-3. Die nachgewiesene enzymatische Aktivität ist daher nicht in *Pichia* Kulturüberstand *per se* enthalten, sondern auf das rekombinante GrB-5 Protein zurückzuführen. Versuche, das Fusionsproteins aus dem Kulturüberstand über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie zu reinigen, waren jedoch nicht erfolgreich, wahrscheinlich aufgrund einer zu geringen Proteinkonzentration (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.23 Analyse der enzymatischen und Zellbindungsaktivität in konzentrierten Überständen von GrB-5 exprimierenden *Pichia* Kulturen.** **A, Nachweis der Granzym B-Aktivität anhand der Spaltung von Caspase-3.** Die Ansätze enthielten 100 ng Caspase-3, 5 und 50 ng entspr. 6,25 und 31,25 nM GrB (Spuren 2, 3 und 4) als Positivkontrolle bzw. 1 und 5 µl fünffach konzentrierten Kulturüberstand einer GrB-5 exprimierenden *Pichia* Kultur (Spuren 5, 6 und 7). In den Ansätzen 4 und 7 wurden zusammen mit der jeweils geringeren Proteinmenge 1 mM des Granzym B-spezifischen Peptidinhibitors Ac-IETD-CHO 5 min. bei Raumtemperatur vor Zugabe von Caspase-3 vorinkubiert. Ctrl.: 1 µl fünffach konzentrierter *Pichia* Überstand einer Kultur, die mit dem leeren pPIC9 transformiert war. **B, Nachweis der Bindung an ErbB2-exprimierende MDA-MB 453 Zellen.** Die Zellen wurden mit 2 µg Granzym B, 100 µl konzentriertem GrB-5 Kulturüberstand oder 100 µl fünffach konzentriertem Überstand einer mit pPIC9 transformierten Kultur für 1 Std. auf Eis inkubiert. Gebundenes Protein wurde mit anti-Myc 9E10 Antikörper und anti-Maus-FITC im FACS detektiert. **C, Western blot zum Nachweis des Fusionsproteins im konzentrierten Überstand.** 500 ng Granzym B, 20 µl des konzentrierten GrB-5-Überstands sowie 20 µl des irrelevanten Kontroll-Überstands wurden über SDS-PAGE und Western blot analysiert. Der Western blot wurde mit anti-Granzym B (Santa Cruz) und anti-Myc 9E10 Antikörper entwickelt.

Der konzentrierte Überstand der GrB-5 exprimierenden *Pichia* Kultur wurde daher außerdem auf Zellbindungsaktivität gegenüber ErbB2-exprimierenden Zellen untersucht, d.h. auf Funktionalität des „single chain“ Antikörpers FRP5. Dazu wurden MDA-MB 453 Zellen mit fünffach konzentriertem GrB-5 Kulturüberstand, entsprechend konzentriertem Überstand einer *Pichia* Kultur, die mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert war, sowie mit gereinigtem, rekombinanten Granzym B behandelt. Gebundenes Protein wurde anschließend mit anti-Myc 9E10 Antikörper, der an den Myc-tag am C-Terminus von Granzym B und GrB-5 bindet, und FITC-markiertem Zweitantikörper im FACS detektiert. Die FACS-Daten sind in Abb. 3.23 B graphisch dargestellt. Während der irrelevante *Pichia* Kulturüberstand keinen shift im Vergleich zu unbehandelten Zellen hervorruft, die nur mit den Antikörpern angefärbt wurden (nicht gezeigt), bindet Granzym B an die Zellen, was mit den Beobachtungen aus Immunfluoreszenz-Experimenten (3.2.4) und Veröffentlichungen in der Literatur [Motyka, 2000; Froelich, 1996b] übereinstimmt. Das im GrB-5 Kulturüberstand enthaltene

rekombinante Protein bindet dagegen stärker an MDA-MB 453 Zellen als Granzym B, was darauf hindeutet, daß durch den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 eine spezifische Bindung an ErbB2-positive Zellen erzielt werden kann.

Zusammen mit den oben beschriebenen Daten, die Granzym B Aktivität des Fusionsproteins zeigen, deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß das GrB-5 Fusionsprotein funktional ist und sowohl enzymatische Aktivität als auch Zellbindungsaktivität besitzt, die durch den „single chain“ Antikörper vermittelt wird. Im Western blot wurde daraufhin nochmals versucht, das rekombinante Protein in dem konzentrierten Kulturüberstand nachzuweisen. Gereinigtes Granzym B, konzentrierter GrB-5 Kulturüberstand sowie Überstand einer Vektor-transformierten Kontroll-Kultur wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Abbildung 3.23 C zeigt die Western blots, die mit anti-Granzym B und anti-Myc 9E10 Antikörper entwickelt wurden. Während das als Positivkontrolle aufgetragene Granzym B in beiden Fällen eine Bande von ca. 40 kDa ergab, konnte mit dem anti-Granzym B Antikörper im GrB-5 Überstand ein Protein der Größe 65 kDa nachgewiesen werden, was etwa der erwarteten molaren Masse von GrB-5 entspricht. Im anti-Myc Western blot wurden dagegen nur zwei kleinere Proteine detektiert, bei denen es sich um C-terminale Fragmente des Fusionsproteins handeln muß. Die entsprechenden N-terminalen Fragmente konnten mit dem anti-Granzym B Antikörper allerdings nicht nachgewiesen werden. Der konzentrierte Überstand der GrB-5 exprimierenden *Pichia* Kultur enthielt daher neben dem vollständigen Fusionsprotein auch Abbauprodukte, so daß die nachgewiesene Enzymaktivität und Zellbindung nicht mit Sicherheit auf das Fusionsprotein zurückgeführt werden können, sondern auch durch Aktivitäten der Abbauprodukte hervorgerufen werden könnten.

Eine zytotoxische Wirkung des fünffach konzentrierten GrB-5 Kulturüberstands auf ErbB2-exprimierende Tumorzelllinien konnte nicht beobachtet werden (nicht gezeigt), was mit der zu geringen Proteinkonzentration oder dem Fehlen einer „endosome escape“ Funktion erklärt werden könnte.

Versuche, das rekombinante GrB-5 aus dem Überstand von Expressionskulturen über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie zu reinigen, waren ebenfalls nicht erfolgreich (nicht gezeigt). Die Menge an GrB-5 in dem konzentrierten Überstand war darüber hinaus so gering, daß im Folgenden alternative Möglichkeiten zur Herstellung von Granzym B-scFv(FRP5)-Fusionen untersucht wurden.

### **Zusammenfassung**

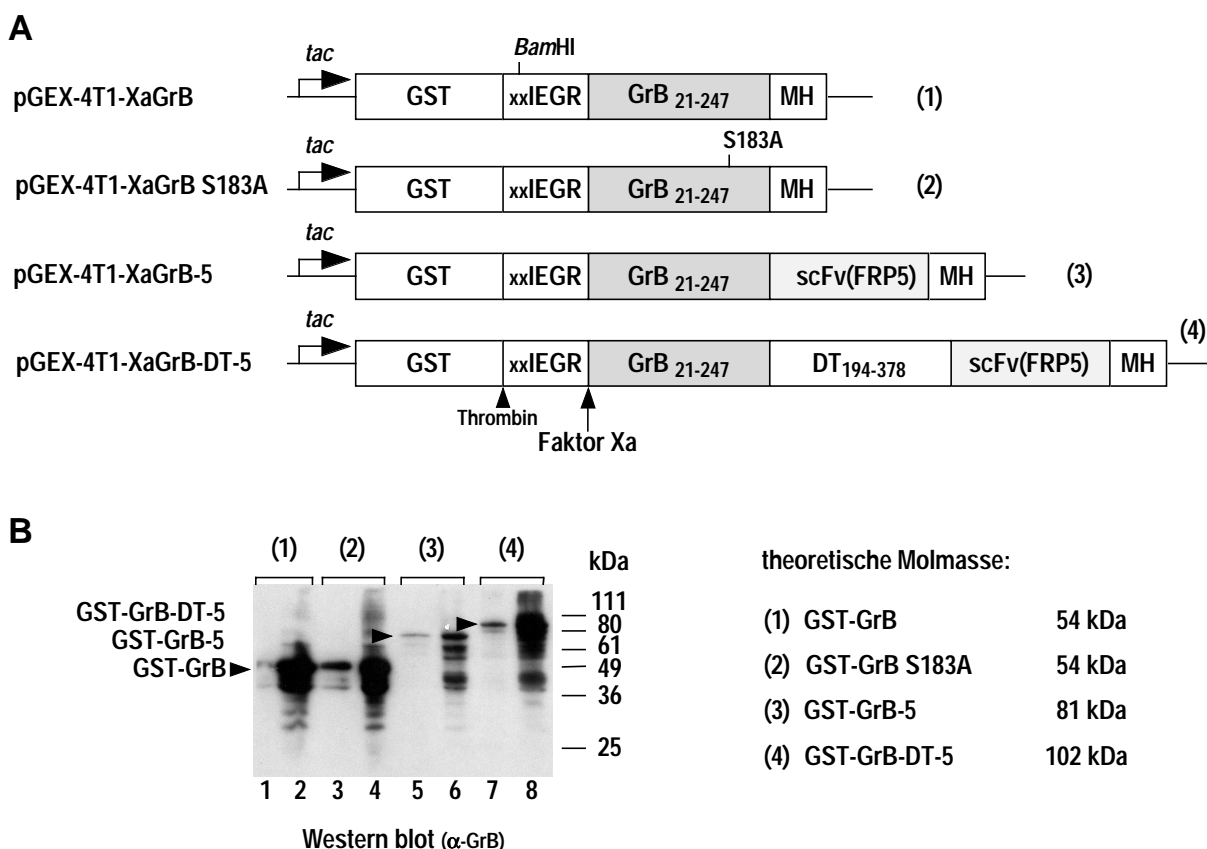
Mit den in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukten war es nicht möglich, Granzym B-Antikörper Fusionsproteine in signifikanter Ausbeute in der Hefe *Pichia pastoris* zu exprimieren. Während kein vollständiges GrB-DT-5 nachgewiesen werden konnte, führte die Expression von GrB-5 zwar zu rekombinantem Protein der erwarteten Größe, daneben wurden jedoch auch niedermolekulare Abbauprodukte beobachtet. Versuche, das rekombinante Protein über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie zu reinigen, waren nicht erfolgreich. Allerdings konnte in konzentriertem Überstand von GrB-5 *Pichia* Kulturen enzymatische Aktivität nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, daß die Fusion heterologer Protein-domänen an den C-Terminus von Granzym B nicht zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt. In einem FACS-Experiment konnten darüber hinaus erste Hinweise darauf gewonnen werden, daß der „single chain“ Antikörper im Fusionsprotein ebenfalls funktional ist und an ErbB2 bindet. Ob die Zellbindungsaktivität auf das vollständige Fusionsprotein oder ein



Abbauprodukt zurückgeht, konnte dagegen nicht geklärt werden. Eine zytotoxische Wirkung des fünffach konzentrierten GrB-5 Kulturüberstands auf ErbB2-exprimierende Tumor-Zelllinien konnte jedoch nicht beobachtet werden.

### 3.3.4 Expression von Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen in *E. coli* als GST-Fusionen mit modifizierter Faktor Xa Spaltstelle

Es soll an dieser Stelle nochmal darauf hingewiesen werden, daß die Expression von enzymatisch aktivem Granzym B in *E. coli* bisher nicht beschrieben wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten eigenen Versuche zur Expression von Granzym B in *E. coli*, die unter 3.1.4 dargestellt sind, waren ebenfalls nicht erfolgreich. Da in der Hefe *Pichia pastoris*, die als geeignetes Expressionssystem für aktives Granzym B etabliert werden konnte, die Produktion von Granzym B-Fusionsproteinen nur zu sehr geringen Ausbeuten und Abbauprodukten führte, wurde dennoch ein weiterer Ansatz zur Herstellung von aktivem Granzym B in *E. coli* verfolgt.



**Abbildung 3.24 Expression von Granzym B und Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen in *E. coli* als GST-Fusionen. A, Expressionskonstrukte.** Die Vektoren wurden wie im Text beschrieben konstruiert. **B, Expressionsanalyse.** Im Western blot wurden Aliquots von Expressionskulturen vor und nach Induktion der Proteinexpression analysiert. Der blot wurde mit anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) entwickelt. Als Proben vor und nach Induktion der Proteinexpression wurden Volumina aufgetragen, die der gleichen OD<sub>600</sub> entsprachen.

In diesem neuen Ansatz zur Expression von Granzym B sowie von Granzym B-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden Fusionen mit GST so konstruiert, daß nach Abspaltung von GST der N-Terminus von reifem Granzym B entsteht. Auf diese Weise sollte das Problem, daß bei der Expression der cDNA von reifem Granzym B in *E. coli* ein zusätzliches Methionin an den N-Terminus angefügt wird (vgl. 3.1.3), umgangen werden.

In den Vektor pGEX-4T1 wurden die Granzym B-Konstrukte, die in Abb. 3.24 A dargestellt sind, zwischen die BamHI und NotI sites inseriert. Die Granzym B- bzw. Granzym B-Antikörper-Fragmente wurden über PCR mit den Oligonukleotiden „5' BamHI GrB für pGEX“ und „3' NotI GrB für pGEX“ bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C an den entsprechenden pPIC9 Vektoren als template synthetisiert, die unter 3.3.3 beschrieben wurden. Mit dem 5' primer wurde eine zusätzliche Faktor Xa Schnittstelle (Ile-Glu-Gly-Arg\*; \*: Spaltung durch Faktor Xa) so eingefügt, daß nach Spaltung der N-Terminus von reifem Granzym B ohne zusätzliche Aminosäuren entsteht. Die resultierenden Plasmide pGEX-4T1[XaGrB], pGEX-4T1[XaGrB S183A], pGEX-4T1[XaGrB-5] und pGEX-4T1[XaGrB-DT-5] wurden durch Ansequenzierung von beiden Enden verifiziert.

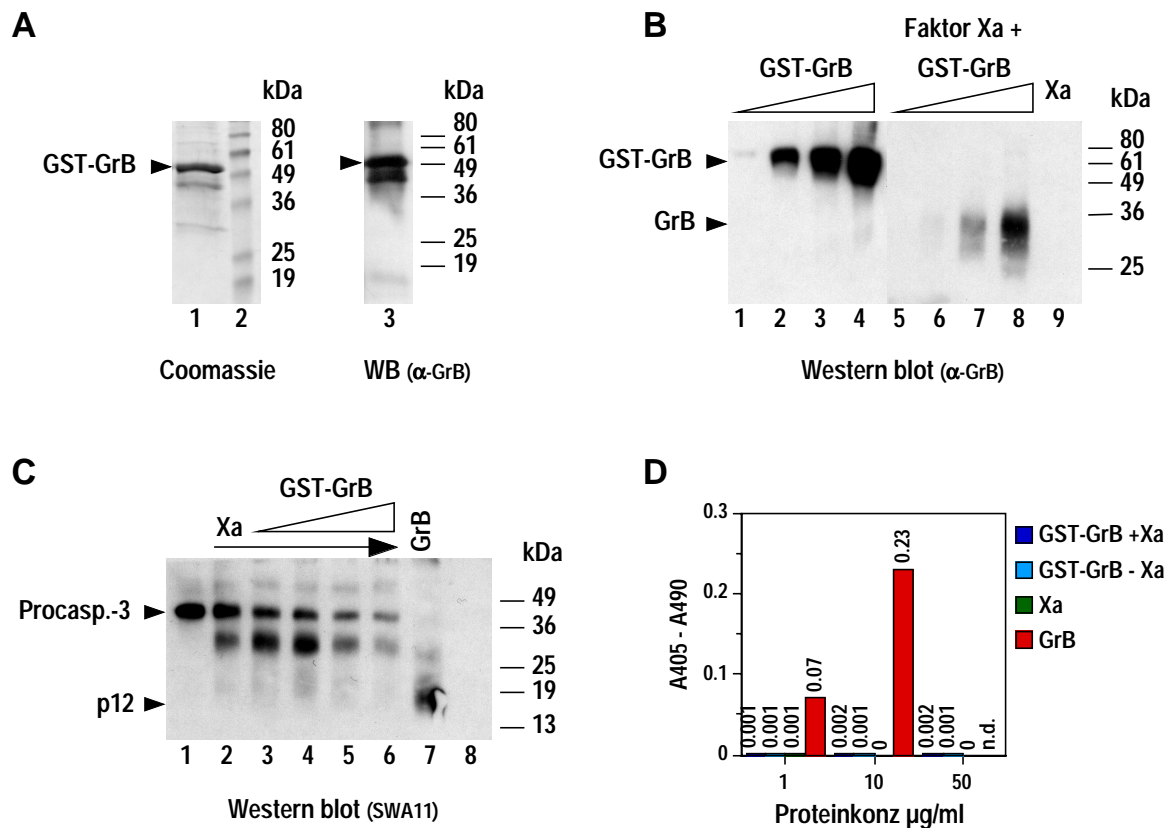
*E. coli* XL1 blue wurden mit den Plasmiden transformiert, und aus Einzelklonen wurden Expressionskulturen herangezogen, die mit IPTG für 8 Stunden bei Raumtemperatur induziert wurden. Aliquots dieser Kulturen vor und nach Induktion der Proteinexpression wurden durch SDS-PAGE und Western blot auf das Vorliegen der rekombinanten Proteine analysiert. Alle Proteine konnten in *E. coli* exprimiert werden, und die molaren Massen stimmten mit den berechneten gut überein (Abb. 3.24 B).

### ***Reinigung von GST-GrB, Abspaltung von GST und Untersuchung der enzymatischen Aktivität***

Ursprünglich war vorgesehen, die nativen GST-Fusionsproteine zur Reinigung an Glutathion-Agarose zu immobilisieren und den GST-Anteil anschließend mit Faktor Xa abzuspalten. Dabei war das Ziel, zunächst zu untersuchen, ob auf diese Weise enzymatisch aktives Granzym B hergestellt werden kann.

GST-GrB konnte jedoch nicht über Glutathion-Agarose gereinigt werden, da das Protein fast vollständig unlöslich war. Verschiedene Versuche, durch Variation der Expressionsbedingungen (der Temperatur und Induktionszeit, Reprimierung mit Glukose oder Verzicht auf Induktion mit IPTG) lösliches Protein zu erhalten, waren ebenfalls nicht erfolgreich. GST-GrB wurde daher in 8 M Harnstoff solubilisiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Abbildung 3.25 A zeigt ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel sowie einen Western blot von gereinigtem GST-GrB. Die Ausbeute betrug ca. 50 mg pro Liter Expressionskultur.

Zur Renaturierung des Proteins und Abspaltung von GST wurde die Harnstoff-haltige Eluatfraktion, die GST-GrB in einer Konzentration von ca. 10 mg/ml enthielt, 1:100 in Faktor Xa Spaltpuffer (2.2.3.9) verdünnt und ausgefallenes Protein 5 Minuten bei 14000 Upm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Faktor Xa versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde GST-GrB ohne Faktor Xa entsprechend behandelt. Die Analyse beider Ansätze durch SDS-PAGE und Western blot zeigte, daß GST vollständig abgespalten werden konnte (Abb. 3.25 B Spuren 7 und 8). Auf einem mit Silber gefärbten SDS-Gel konnten ebenfalls beide Spaltprodukte detektiert werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.25 A, Denaturierende Reinigung von GST-GrB.** Das Protein wurde aus dem Bakterienpellet einer Expressionskultur, die für 8 Std. bei Raumtemperatur mit IPTG induziert wurde, mit 8 M Harnstoff solubilisiert und über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluat-Fraktion wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie Western blotting analysiert. Der blot wurde mit monoklonalem anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) entwickelt. **B, Abspaltung von GST mit Faktor Xa.** 10  $\mu\text{l}$  des Harnstoff-haltigen Eluats, das GST-GrB in einer Konzentration von 10 mg/ml enthielt, wurden 1:100 in 990  $\mu\text{l}$  Faktor Xa Spaltpuffer verdünnt und mit 1  $\mu\text{l}$  (1 U) Faktor Xa zur Abspaltung von GST über Nacht bei 37°C behandelt. Von diesem Ansatz wurden 1, 5, 10 und 20  $\mu\text{l}$  auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine im anti-Granzym B Western blot nachgewiesen (Spuren 5-8). GST-GrB, das ohne Faktor Xa entsprechend behandelt wurde, wurde als Kontrolle aufgetragen (Spuren 1-4). Spur 9: nur Faktor Xa, wie in dem Spaltansatz 1:1000 verdünnt. **C, D, Analyse der enzymatischen Aktivität nach Abspaltung von GST.** **C,** 100 ng rekombinante Caspase-3 wurden mit 0,5, 1, 5 und 10  $\mu\text{l}$  (entspr. 50, 100, 500 und 1000 ng) GST-GrB, das zuvor 1:100 in Faktor Xa Spaltpuffer verdünnt wurde, sowie 1U/ $\mu\text{l}$  Faktor Xa über Nacht bei 37°C inkubiert (Spuren 3-6). Die Ansätze wurden über SDS-PAGE und Western blot auf Freisetzung der p12 Caspase-3 Untereinheit analysiert. Spur 2: Caspase-3 und Faktor Xa ohne GST-GrB; Spur 7: Caspase-3 und 500 ng Granzym B aus *Pichia pastoris*; Spur 8: nur Faktor Xa ohne Caspase-3 und GST-GrB. **D,** 1, 10 und 50  $\mu\text{l}$  des Spaltansatzes aus B, die ursprünglich 0,1, 1 und 5  $\mu\text{g}$  GST-GrB enthielten, wurden mit dem Granzym B-spezifischen colorimetrischen Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA (200  $\mu\text{M}$ ) sowie 10 mM DTT versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung nach Spaltung durch Granzym B wurde anhand der Extinktion bei 405 nm im Vergleich zu der bei 490 nm gemessen.

Aliquots dieser Spaltansätze wurden darüber hinaus mit dem colorimetrischen Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA versetzt, um zu untersuchen, ob das rekombinante Granzym B nach Abspaltung von GST enzymatische Aktivität besitzt. Während wie in Abb. 3.25 D gezeigt Granzym B aus *Pichia pastoris* das Substrat spaltet und zur Freisetzung des gelben p-Nitroanilins führt, konnte eine Farbentwicklung weder durch GST-GrB noch durch GST-GrB nach Abspaltung von GST hervorgerufen werden. Gleichmaßen war GST-GrB

nach Inkubation mit Faktor Xa nicht in der Lage, Caspase-3 zu spalten (Abb. 3.25 C). Die Spaltansätze enthielten jeweils 100 ng Caspase-3 und 50, 100, 500 oder 1000 ng GST-GrB, das zuvor 1:100 in Faktor Xa Spaltpuffer verdünnt worden war, zusammen mit 1 U/ $\mu$ l Faktor Xa und wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Da Faktor Xa aus zwei über eine Disulfidbrücke verknüpften Peptidketten besteht, wurde kein DTT zugegeben, um die Reduktion der Disulfidbrücke zu vermeiden. Nach Analyse der Spaltansätze über SDS-PAGE und Western blotting konnte aber lediglich ein ca. 30 kDa Caspase-3 Fragment beobachtet werden, das allerdings durch Faktor Xa entsteht (Spur 2). Da dieser Ansatz damit nicht zur Herstellung von enzymatisch aktivem Granzym B in *E. coli* führte, wurde auf die weitere Untersuchung der Antikörper-Fusionsproteine verzichtet.

### **Zusammenfassung**

Sowohl Granzym B als auch GrB-5 und GrB-DT-5 konnten als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden. Diese GST-Fusionen wurden so konstruiert, daß neben der Vektor-kodierten Thrombin Schnittstelle eine zusätzliche Faktor Xa Spaltstelle so eingefügt wurde, daß nach Abspaltung von GST mit Faktor Xa der N-Terminus von reifem Granzym B ohne zusätzliche Aminosäuren entsteht. Da die Expression von Granzym B in *E. coli* bisher nicht beschrieben wurde, wurde zunächst untersucht, ob dieser Ansatz zur erfolgreichen Produktion der aktiven Protease verwendet werden kann. Es war jedoch nicht möglich, GST-GrB in löslicher Form zu exprimieren, so daß das Protein in 8 M Harnstoff solubilisiert und unter denaturierenden Bedingungen über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt wurde. Nach Renaturierung von GST-GrB durch schnelle Verdünnung und Abspaltung von GST konnte allerdings keine enzymatische Aktivität von Granzym B nachgewiesen werden.

### **3.3.5 *In vitro* Biotinylierung von rekombinantem Granzym B und Kopplung mit einem Streptavidin-scFv(FRP5) Fusionsprotein zur spezifischen Aufnahme in Tumorzellen**

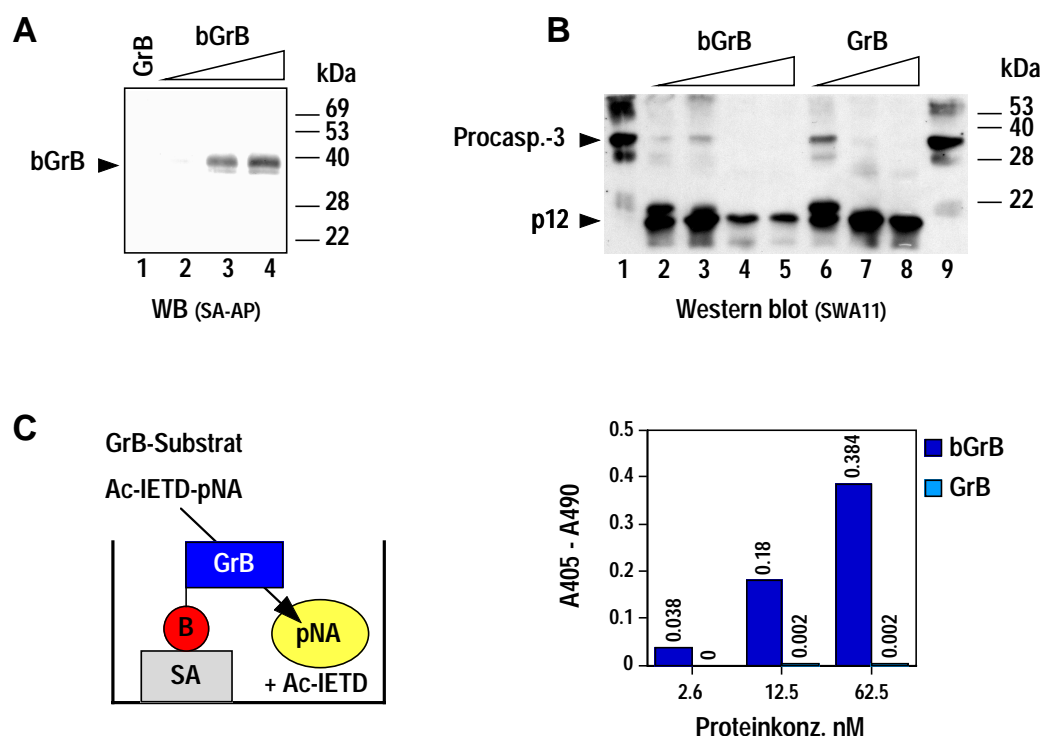
Alle bisher hier beschriebenen Versuche, Granzym B-Antikörper Fusionsproteine herzustellen, die als therapeutisch wirksame Moleküle zur gezielten Induktion von Apoptose in Tumorzellen dienen könnten, waren nicht erfolgreich. In der Hefe *Pichia pastoris*, die zur Produktion von enzymatisch aktivem Granzym B eingesetzt werden konnte, führte die Expression von Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen nur zu sehr geringen Proteinausbeuten, und es konnte kein funktionales Fusionsprotein gereinigt werden. Dagegen konnten verschiedene Granzym B-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden, allerdings konnte in keinem der beschriebenen Ansätze enzymatische Aktivität von Granzym B nachgewiesen werden. Daher wurde versucht, Granzym B und den „single chain“ Antikörper FRP5 separat in *Pichia pastoris* bzw. *E. coli* zu exprimieren und die gereinigten Proteine in einem zweiten Schritt *in vitro* zu koppeln. Als Kopplungssystem wurde das Streptavidin-Biotin-System verwendet. Die Interaktion von Streptavidin, das von *Streptomyces avidinii* sekretiert wird und sehr stabile Tetramere bildet, mit Biotin ist neben der Avidin-Biotin-Interaktion die stärkste bekannte biologische Bindung mit einer Dissoziationskonstante von  $10^{-13}$  M.

Zunächst wurde Granzym B, das in *Pichia pastoris* exprimiert worden war, *in vitro* biotinyliert und auf Erhalt der enzymatischen Aktivität untersucht. Dieses Protein wurde dann in Kopplungsansätzen mit einem Streptavidin-scFv(FRP5) Fusionsprotein eingesetzt, das in

*E. coli* exprimiert, unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und zurückgefaltet wurde und das freundlicherweise von Benjamin Dälken aus unserem Arbeitskreis zur Verfügung gestellt wurde. Die funktionelle Charakterisierung der Komplexe wurde in Zusammenarbeit mit B. Dälken ausgeführt.

### ***In vitro* Biotinylierung von rekombinantem Granzym B aus *Pichia pastoris* und funktionelle Charakterisierung**

Granzym B, das aus dem Überstand einer *Pichia* Expressionskultur gereinigt worden war und enzymatische Aktivität besitzt, aber nicht in HeLa Zellen aufgenommen wird (vgl. 3.2.4), wurde mithilfe des Biotinylierungs-Reagens Sulfo-NHS-Biotin der Firma Pierce wie unter 2.2.3.13 beschrieben *in vitro* biotinyliert. Der Reaktionsansatz wurde anschließend ausgiebig



**Abbildung 3.26 A, *In vitro* Biotinylierung von Granzym B.** Gereinigtes Granzym B aus *Pichia pastoris* wurde wie unter 2.2.3.13 beschrieben mit Sulfo-NHS-Biotin (Pierce) biotinyliert. Die Biotinylierung wurde anschließend im Western blot, der mit Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase und NBT/BCIP entwickelt wurde, nachgewiesen. Auf das Gel wurden 500 ng nicht-biotinyliertes Granzym B (Spur 1) sowie 50, 250 und 500 ng biotinyliertes Granzym B (bGrB; Spuren 2-4) aufgetragen. **B, Nachweis der enzymatischen Aktivität nach Biotinylierung von Granzym B.** 0,5, 5, 50 und 250 ng biotinyliertes Granzym B aus A (Spuren 2-5) sowie 0,5, 5 und 50 ng nicht-biotinyliertes Granzym B (Spuren 6-8) wurden mit 100 ng Caspase-3 über Nacht bei 37°C inkubiert und die Spaltung anhand der Freisetzung der p12 Caspase-3 Untereinheit im Western blot nachgewiesen. Spuren 1, 9: Caspase-3 ohne Granzym B. **C, Nachweis der enzymatischen Aktivität von Biotin-Granzym B (bGrB) nach Bindung an Streptavidin.** Der Versuchsaufbau ist schematisch dargestellt. 100 ng Streptavidin (NEB) in PBS wurden in einer 96 well ELISA-Platte über Nacht bei 4°C immobilisiert. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS für 1 Std. bei Raumtemperatur wurde Biotin-Granzym B oder Granzym B als Kontrolle in den angegebenen Konzentrationen in 0,5% BSA/PBS zur Bindung an Streptavidin zugegeben und 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurde dreimal mit PBS gewaschen und zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Biotin-Granzym B, das an Streptavidin gebunden war, mit dem colorimetrischen Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA (200 µM) in Reaktionspuffer (2.2.3.12) versetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurde die Farbentwicklung anhand der Extinktion bei 405 nm im Vergleich zu der bei 490 nm gemessen.

gegen PBS dialysiert, um überschüssiges Reagens zu entfernen, das andernfalls in nachfolgenden Bindungsexperimenten als Kompetitor für Biotin-Granzym B (bGrB) auftreten würde. Die Biotinylierung wurde im Western blot mit Streptavidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase nachgewiesen (Abb. 3.26 A).

Um zu überprüfen, ob die Biotinylierung zu einem Verlust an enzymatischer Aktivität führt, wurde Biotin-Granzym B in einem Caspase-3 Spaltexperiment im Vergleich zu nicht-biotinyliertem Granzym B eingesetzt. Wie in Abb. 3.26 B gezeigt, sind beide Proteinpräparationen vergleichbar aktiv und führen bei einer Konzentration von 1,25 µg/ml fast zur vollständigen Spaltung von Caspase-3 (Spuren 2 und 6). Darüber hinaus wurde untersucht, ob Biotin-Granzym B auch nach Bindung an Streptavidin noch immer enzymatische Aktivität besitzt. Dazu wurde in einem Bindungsexperiment Streptavidin in einer 96 well ELISA-Platte immobilisiert und mit Biotin-Granzym B bzw. Granzym B als Negativkontrolle inkubiert. Nicht gebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt. Die Aktivität des gebundenen Biotin-Granzym B wurde anschließend durch Zugaben des colorimetrischen, Granzym B-spezifischen Peptidsubstrats Ac-IETD-pNA und Beobachtung der Farbentwicklung nachgewiesen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.26 C dargestellt. Während nicht-biotinyliertes Granzym B nicht an Streptavidin bindet, konnte Biotin-Granzym B an Streptavidin immobilisiert werden und führte zur konzentrationsabhängigen Spaltung des Peptidsubstrats.

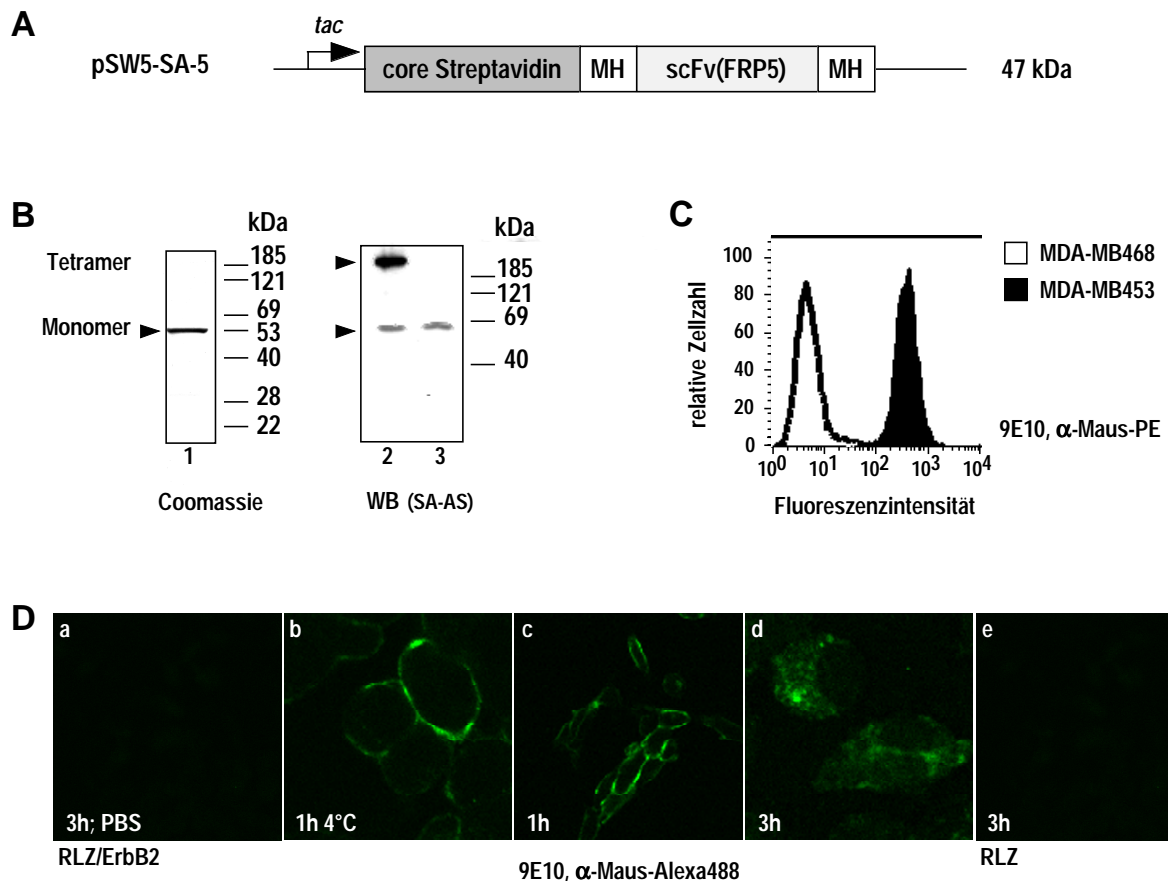
### ***Expression und funktionelle Charakterisierung von Streptavidin-scFv(FRP5)***

Die Konstruktion, Expression, Reinigung und funktionelle Charakterisierung von Streptavidin-scFv(FRP5) (SA-5) wurde von B. Dälken durchgeführt (unveröffentlicht). Die hier gezeigten Daten dienen lediglich dem Verständnis der im folgenden beschriebenen Experimente zur Aufnahme von Biotin-GranzymB/Streptavidin-scFv(FRP5) Komplexen in ErbB2 exprimierende Zellen.

Ein Fusionsprotein, das die Sequenz von core-Streptavidin [Dubel, 1995] und den „single chain“ Antikörper FRP5 enthält, die über ein Myc-Epitop und einen Hexahistidin-tag verbunden sind, die gleichzeitig als Linker dienen (Abb. 3.27 A), wurde von B. Dälken konstruiert und in *E. coli* exprimiert. Das rekombinante Protein wurde in 8 M Harnstoff solubilisiert, über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt und durch Dialyse gegen PBS zurückgefaltet. Das gereinigte, renaturierte Protein bildete wie in der Literatur beschrieben Tetramere [Weber, 1989], die im Coomassie gefärbten SDS-Gel und Western blot neben der monomeren Form nachgewiesen werden konnten (Abb. 3.27 B). Die Funktionalität des „single chain“ Antikörpers wurde in einem Zellbindungsexperiment durch FACS nachgewiesen, das in Abb. 3.27 C dargestellt ist. Während SA-5 nicht an MDA-MB 468 Zellen bindet, die nur sehr wenig ErbB2 exprimieren, konnte eine starke Bindung an MDA-MB 453 Zellen detektiert werden, die ErbB2 überexprimieren. Nach Immobilisierung von SA-5 an ErbB2 konnte die Funktionalität des Streptavidin-Anteils in einem ELISA-ähnlichen Bindungs-assay mit biotinylierter Alkalischer Phosphatase nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Nachdem damit gezeigt werden konnte, daß beide Domänen von SA-5 für sich funktional sind, wurde die Aufnahme von SA-5 in ErbB2-exprimierende Zellen untersucht. Die Klärung der Frage, ob das Molekül an sich über Rezeptor-vermittelte Endozytose in ErbB2-positive Zellen aufgenommen werden kann, war eine wichtige Voraussetzung für die weitere Verwendung von SA-5 als „Transportmolekül“ für biotinylierte Proteine wie Biotin-Granzym B. Dazu wurden murine Nierenkarzinom Zellen Renca-lacZ/ErbB2, die mit der humanen *erbB2* cDNA stabil transfiziert sind, wurden dazu mit SA-5 bei 4°C oder bei 37°C inkubiert und die

Bindung des Proteins an die Zellen bzw. die Aufnahme in die Zellen über Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-Myc 9E10 Antikörper und Alexa488 Fluoreszenz-markiertem Zweitantikörper nachgewiesen. Die Zellen, die durch CLSM analysiert wurden, sind in Abb. 3.27 D dargestellt. Als Negativkontrolle wurden Renca-lacZ Zellen eingesetzt, die kein humanes ErbB2 exprimieren. Die Lokalisation von SA-5 im Zytoplasma von Renca-lacZ/ErbB2 Zellen und damit die Aufnahme in die Zellen konnte nach 3 Stunden eindeutig nachgewiesen werden (Bild d). Dagegen erfolgt keine Aufnahme von SA-5 in Renca-lacZ Zellen (Bild e).

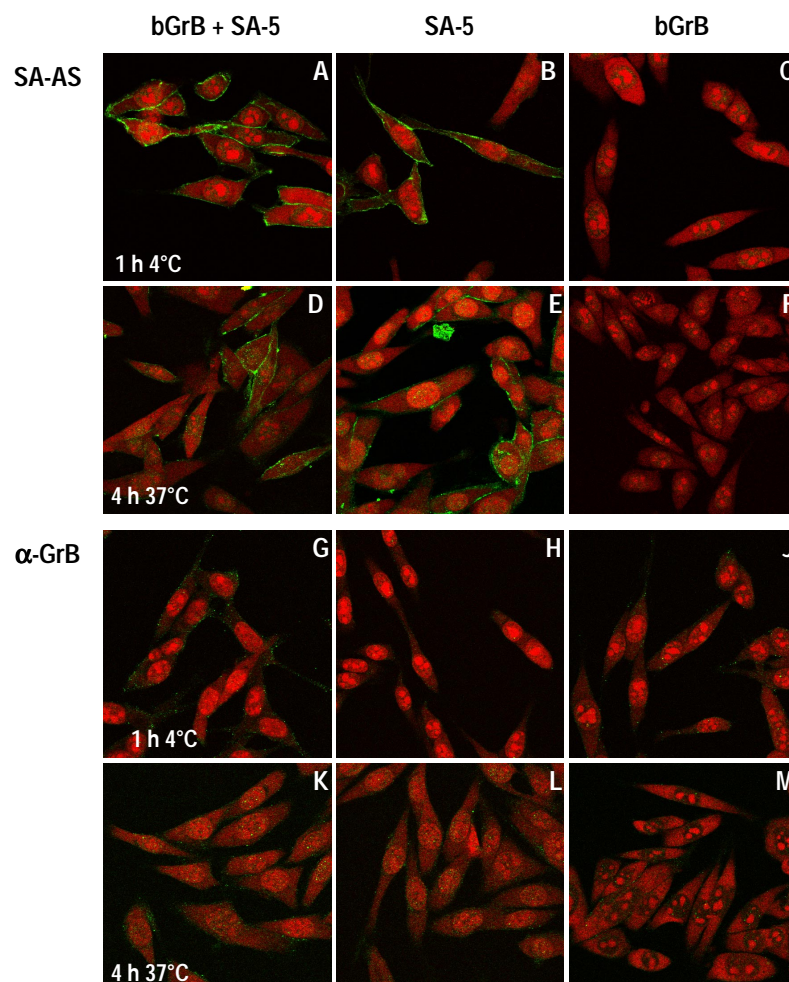


**Abbildung 3.27 Expression und funktionelle Charakterisierung von SA-5.** **A, Expressionskonstrukt.** **B, Coomassie Gel und Western blot von gereinigtem SA-5.** SA-5 wurde in *E. coli* XL1 blue überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie gereinigt. Das zurückgefaltete Protein wurde auf einem reduzierenden SDS-Gel und Coomassie Färbung bzw. Western blotting analysiert. Zum Nachweis der Streptavidin-Tetramere wurde das Protein in 0,5x SDS-Probenpuffer bei 50°C (Spur 2) bzw. 95°C (Spuren 1,3) denaturiert. Der Western blot wurde mit Streptavidin-Antiserum (Sigma) entwickelt. **C, Bindung von SA-5 an ErbB2-exprimierende MDA-MB 453 Zellen.** Die spezifische Bindung von SA-5 an ErbB2 exprimierende Zellen wurde im FACS mit anti-Myc 9E10 Antikörper und anti-Maus-PE Zweitantikörper nachgewiesen. **D, Aufnahme von SA-5 in Renca-lacZ/ErbB2 Zellen.** Renca-lacZ/ErbB2 (RLZ/ErbB2) oder Renca-lacZ (RLZ) Zellen wurden für 1 Std. mit 10  $\mu\text{g/ml}$  SA-5 oder PBS (Bild a) bei 37°C inkubiert. Das Protein wurde durch Waschen entfernt, und die Zellen wurden wie angegeben weiterhin bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis der Zellbindung von SA-5 wurden die Zellen 1 Std. bei 4°C inkubiert (Bild b). SA-5 wurde mit anti-Myc 9E10 und Alexa488-gekoppeltem Zweitantikörper und CLSM nachgewiesen.



### Untersuchung der Aufnahme von Biotin-Granzym B/Streptavidin-scFv(FRP5)-Komplexen in ErbB2-exprimierende Zellen

Um zu untersuchen, ob Biotin-Granzym B (bGrB) mithilfe von Streptavidin-scFv(FRP5) (SA-5) in ErbB2-exprimierende Zellen aufgenommen werden kann, wurden beide Proteine zur Komplexbildung gemischt. Pro Streptavidin-Monomer kann ein Biotin-Molekül gebunden werden, d.h. die theoretische Stöchiometrie von bGrB und SA-5 beträgt im Komplex 1:1. Da die Effizienz der Biotinylierungsreaktion nicht überprüft werden konnte und daher nicht mit Sicherheit davon auszugehen war, daß jedes Granzym B-Molekül biotinyliert war, wurde bGrB in einem zweifachen Überschuß eingesetzt. Zur Bildung von bGrB-SA-5-Komplexen wurden 7 ng bGrB (entspr. 17,5 pmol) und 5 ng SA-5 (entspr. 8,6 pmol) in einem Gesamtvolumen von 50 µl PBS gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Hochmolekulare Aggregate wurden anschließend durch Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C für 15 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde mit Renca-lacZ/ErbB2 Zellen, die zuvor auf „8 well“ Objektträgern ausgesät und über Nacht kultiviert wurden, für eine Stunde bei 37°C oder auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden



**Abbildung 3.28 Aufnahme von bGrB-SA-5-Komplexen in Renca-lacZ/ErbB2 Zellen.** Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden mit bGrB, SA-5 und Komplexen aus bGrB und SA-5, die wie im Text beschrieben hergestellt wurden, für 1 Std. auf Eis oder bei 37°C inkubiert. Die zelluläre Lokalisation der Proteine wurde anschließend mit anti-Granzym B Antikörper (Santa Cruz) und Streptavidin Antiserum (Sigma) sowie Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern (grün) durch CLSM nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Propidiumjodid (rot) angefärbt.



anschließend gewaschen und fixiert (4°C Ansätze) oder mit neuem Medium versetzt und weitere drei Stunden bei 37°C inkubiert (37°C Ansätze). Die Lokalisation der Proteine wurde durch Immunfluoreszenz-Färbung mit anti-Granzym B Antikörper und Streptavidin Antiserum (SA-AS) sowie Analyse der Zellen durch CLSM bestimmt.

Die in Abbildung 3.28 dargestellten Bilder zeigen, daß SA-5, nachgewiesen durch das Streptavidin-Antiserum, an die Zellen bindet (Bild B) und, wenn auch in deutlich schwächerem Ausmaß als in Abb. 3.27 D dargestellt, in die Zellen internalisiert (Bild E). Die Detektion von intrazellulärem SA-5 in unterschiedlichen Mengen in Abb. 3.27 D und dem hier gezeigten Bild könnte durch die Verwendung von anti-Myc Antikörper (Abb. 3.27 D) im Gegensatz zu Streptavidin Antiserum begründet liegen. Da Granzym B jedoch ebenfalls einen Myc-tag besitzt, wurde hier zur Unterscheidung beider Proteine das Streptavidin Antiserum verwendet.

Durch Anfärben der Zellen mit dem Granzym B Antikörper wurde untersucht, ob bGrB nach Komplexbildung vermittelt durch SA-5 an Zellen binden und in die Zellen aufgenommen werden kann. Es konnte jedoch nur eine äußerst schwache Bindung von bGrB im Komplex mit SA-5 an die Zellen nachgewiesen werden (Bild G). Intrazelluläres Protein wurde dagegen mit dem anti-Granzym B Antikörper nicht angefärbt (Bild K). Nicht-komplexiertes Biotin-Granzym B bindet wie oben erläutert nicht an die Zellen und wird folglich auch nicht in die Zellen aufgenommen (Bilder J,M). Die Variation der Konzentrationsverhältnisse und Inkubationszeit zur Bildung von Komplexen aus bGrB und SA-5 führte ebenfalls nicht zur SA-5-vermittelten Aufnahme von Biotin-Granzym B in die Zellen. Eine zytotoxische Wirkung der bGrB-SA-5-Komplexe auf Zellen konnte darüber hinaus in MTT-Tests gleichermaßen nicht beobachtet werden (nicht gezeigt).

### **Zusammenfassung**

Rekombinantes Granzym B, das aus *Pichia* Expressionskulturen gereinigt wurde, konnte ohne Verlust der enzymatischen Aktivität *in vitro* biotinyliert werden. Ein Fusionsprotein SA-5, das Streptavidin und den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 enthält, wurde in *E. coli* exprimiert und bindet sowohl Biotin als auch an ErbB2-exprimierende Zellen. In diese Zellen wurde darüber hinaus Internalisierung von SA-5 beobachtet. Die Behandlung von Zellen mit Komplexen aus SA-5 und Biotin-Granzym B (bGrB) führte dagegen nicht zur Aufnahme von bGrB. Ein zytotoxischer Effekt auf die Zellen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden.

## **3.4 Caspase-3 als Effektorfunktion in Tumorzell-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen: Konstruktion und funktionelle Charakterisierung**

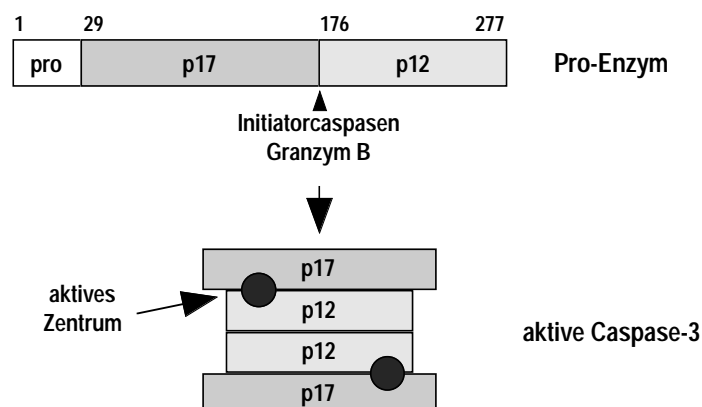
Neben Granzym B wurde Caspase-3 als alternative Effektorfunktion für Immuntoxin-ähnliche Antikörper-Fusionsproteine untersucht, die gezielt in Tumorzellen aufgenommen werden und zur Induktion von Apoptose führen könnten (vgl. 3.3.2). Caspase-3 stellt ein besonders interessantes Effektormolekül dar, da die Aktivierung von Caspase-3 im Verlauf der Apoptose-Signalkaskade wahrscheinlich als letzter und entscheidender Schritt erfolgt, in dem die

verschiedenen Signale zusammenlaufen. Aktivierte Caspase-3 ist für die Spaltung der meisten bisher beschriebenen Caspasen-Substrate verantwortlich, deren Proteolyse den apoptotischen Phänotyp der Zelle hervorruft (vgl. 1.2.1). Damit übt aktive Caspase-3 ihren zellulären Effekt jenseits der verschiedenen Regulationsmechanismen aus, die die Induktion von apoptotischem Zelltod streng kontrollieren, und auch die meisten Mechanismen in Tumorzellen, die Apoptose zugunsten des Überlebens der entarteten Zellen verhindern, beeinflussen die Signalleitung oberhalb von Caspase-3. Diese Deregulierungen der Apoptose-Signalwege, wie z. B. p53 Mutationen, Überexpression von Bcl-2 oder Blockierung des Fas-Rezeptor-Wegs, können zwar die Aktivierung von zellulärer Caspase-3 verhindern, inhibieren aber aktive Caspase-3 selber nicht. Das Einschleusen von aktiver Caspase-3 in Tumorzellen wäre damit möglicherweise eine sehr effiziente Strategie zur Induktion von Apoptose und Bekämpfung des Tumorwachstums.

Die Herstellung von aktiver Caspase-3 in *E. coli* wurde in der Literatur beschrieben [Rotonda, 1996; Mittl, 1997; Roy, 2001]; die besondere Schwierigkeit bei der Verwendung aktiver Caspase-3 als Effektorfunktion in Antikörper-Fusionsproteinen besteht jedoch darin, daß das Enzym als Heterodimer aus den beiden p12 und p17 Untereinheiten vorliegt und als Tetramer  $(p12\ p17)_2$  aktiv ist. Zur Induktion von Apoptose durch aktive Caspase-3 müssen daher einerseits beide Untereinheiten, die nicht-kovalent verbunden sind, in die Zelle aufgenommen werden, ohne daß das Proteindimer zerstört wird. Andererseits war zu klären, ob die Fusion heterologer Proteindomänen wie ein „single chain“ Antikörper an eine der beiden Untereinheiten von Caspase-3 unter Erhalt der Proteinstruktur und enzymatischen Aktivität möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst nicht-modifizierte aktive Caspase-3 hergestellt (3.4.1). Unter 3.4.2 und 3.4.3 sind dann verschiedene Ansätze zur Konstruktion Immuntoxin-ähnlicher Proteine durch Fusion einer der beiden Caspase-3 Untereinheiten mit dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 beschrieben.

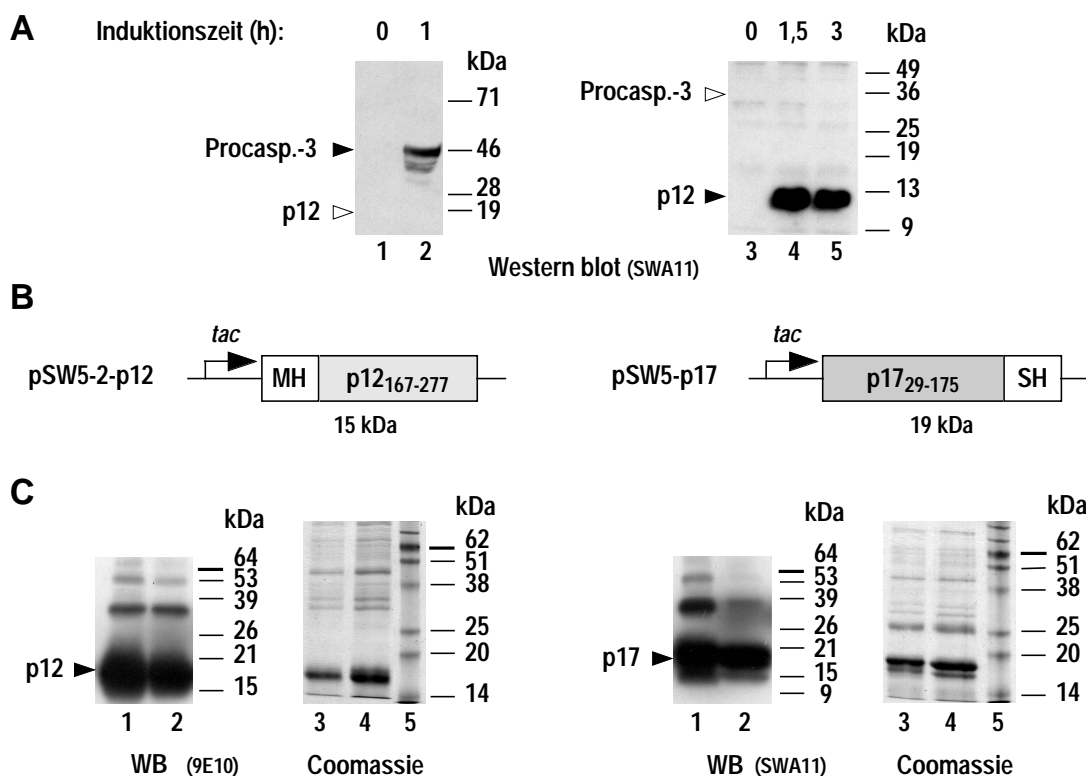
### 3.4.1 Expression enzymatisch aktiver Caspase-3 in *E. coli*



**Abbildung 3.29 Untereinheitenstruktur von Caspase-3.** Caspase-3 wird konstitutiv in allen Körperzellen exprimiert, liegt jedoch in nicht-apoptotischen Zellen als inaktives Proenzym im Zytoplasma vor. Bei Aktivierung erfolgt zunächst die Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten. Die Prodomäne wird anschließend autokatalytisch entfernt. Das aktive Enzym bildet ein Tetramer aus zwei  $(p12\ p17)$  Heterodimeren, die jeweils ein aktives Zentrum besitzen.

Caspase-3 wird, wie in der Einleitung unter 1.2.1 beschrieben, konstitutiv in allen Körperzellen exprimiert, liegt jedoch in nicht-apoptotischen Zellen in Form des inaktiven Proenzym vor. Zur Aktivierung wird Caspase-3 wie in Abbildung 3.29 dargestellt durch andere Caspasen oder Granzym B zwischen den Untereinheiten gespalten. Die Abspaltung der Prodomäne erfolgt in einem zweiten Schritt durch Autokatalyse. Aktive Caspase-3 besteht damit aus zwei Peptiden p12 und p17, die ein Tetramer aus zwei (p12 p17) Heterodimeren bilden.

Zwei unterschiedliche Strategien zur Produktion rekombinanter aktiver Caspase-3 in *E. coli* wurden in der Literatur beschrieben: Ein Ansatz geht von der separaten Expression beider Untereinheiten aus, die in Guanidinium-Hydrochlorid denaturiert werden. Durch Mischen beider Untereinheiten und gemeinsame Renaturierung erfolgt anschließend die Rekonstitutionierung des aktiven Enzyms [Rotonda, 1996]. Alternativ kann die cDNA der Proform in *E. coli* exprimiert werden, die sich bei Induktionszeiten über einer Stunde autokatalytisch in die aktive Form umwandelt (Abb. 3.30 A; [Roy, 2001]).



**Abbildung 3.30 Expression von aktiver Caspase-3 in *E. coli*.** **A, Die Expression von Procaspase-3 führt bei Induktionszeiten über einer Stunde zur autokatalytischen Prozessierung.** Aliquots von Expressionskulturen, die mit dem unter 3.1.5 beschriebenen Vektor pSW5[Caspase-3] transformiert waren, wurden in SDS-Probenpuffer lysiert, auf einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und durch Western blot mit SWA11 Antikörper analysiert. Der Antikörper bindet an den Epitop-tag, der an den C-Terminus von Caspase-3 angefügt wurde. Nach Prozessierung wird daher die p12 Untereinheit detektiert. **B, Expressionskonstrukte für die separate Expression der p12 und p17 Untereinheiten.** Die Plasmide wurden wie im Text beschrieben konstruiert. An den N-Terminus von p12 wurde die Sequenz kodierend für ein Myc-Epitop und einen Hexahistidin-tag (MH) angefügt, an den C-Terminus von p17 ein SWA11-Epitop und ein Hexahistidin-tag (SH). **C, Coomassie-gefärbte SDS-Gele und Western blots von gereinigtem p12 und p17.** Die p12 und p17 Untereinheiten wurden in *E. coli* XL1 blue überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluatfraktionen 1 und 2 (Spuren 1 und 2) wurden durch Western blot mit anti-Myc 9E10 bzw. SWA11-Antikörper analysiert. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel zeigt 1 und 2  $\mu$ g gereinigtes Protein (Spuren 3 und 4). Spur 5: Markerproteine.

In dieser Arbeit wurde aktive Caspase-3 nach der ersten der beiden Strategien durch separate Expression der p12 und p17 Untereinheiten und Rekonstituierung des aktiven Enzyms aus den Einzelkomponenten hergestellt. Dazu wurde die cDNA von p12 und p17 über PCR an pBIIKS[Caspase-3] mit den primern „5' p12 XbaI, NdeI Casp3“ und „3' p12 XhoI, BglIII Casp3“ bzw. „5' p17 BamHI, NdeI Casp3“ und „3' p17 SacI, XbaI Casp3“ bei Hybridisierungstemperaturen von 48°C (p12) bzw. 55°C (p17) amplifiziert, in pBIIKS subkloniert und durch Sequenzierung verifiziert. Zur Gewinnung der Expressionskonstrukte wurde die p17 cDNA zwischen die NdeI und XbaI sites von pSW50mh inseriert, die cDNA der p12 Untereinheit zwischen die XbaI und XhoI sites von pSW5-2. In den resultierenden Plasmiden pSW5-2[p12] und pSW5[p17sh] wird an den N-Terminus von p12 die DNA-Sequenz kodierend für ein Myc-Epitop und ein Hexahistidin-tag angefügt, an den C-Terminus von p17 ein SWA11-Epitop und ein Hexahistidin-tag (Abb. 3.30 B).

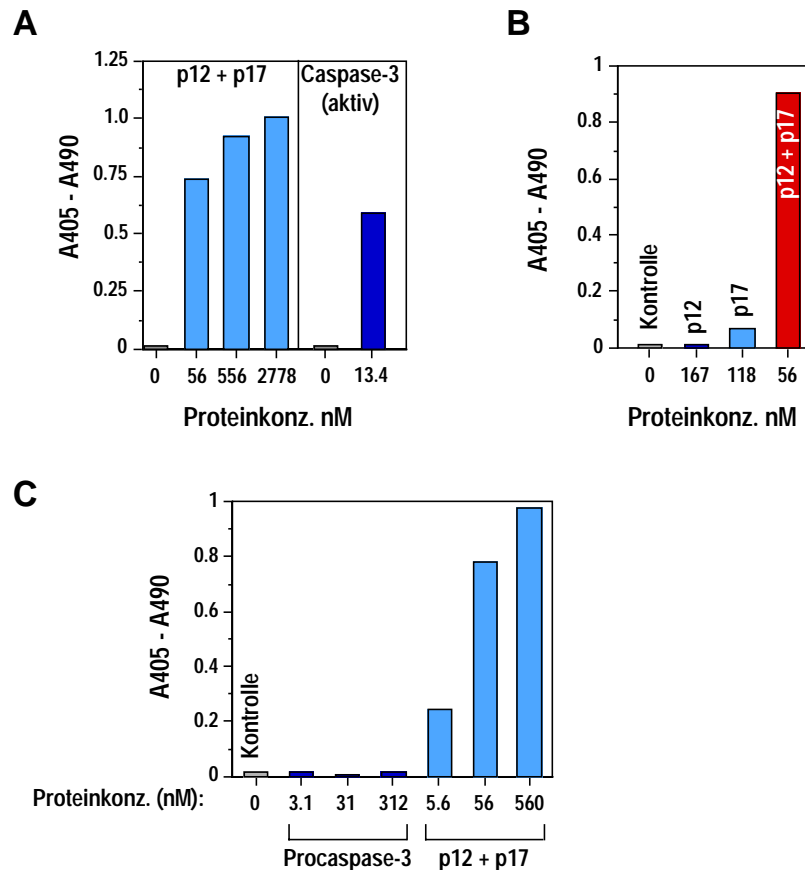
Beide Konstrukte wurden in *E. coli* XL1 blue überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteinausbeute betrug ca. 1 mg je Liter Expressionskultur. In Abbildung 3.30 C sind Coomassie gefärbte SDS-Gele und Western blots der gereinigten Proteine dargestellt.

Zur Rekonstituierung von aktiver Caspase-3 aus den beiden Untereinheiten wurden die Harnstoff-haltigen Eluate zunächst gegen 6 M Guanidinium-Hydrochlorid-Puffer dialysiert, um das denaturierende Agens auszutauschen. Die in Guanidinium-Hydrochlorid denaturierten p12 und p17 Proteine wurden dann wie unter 2.2.3.7 beschrieben äquimolar gemischt und durch Dialyse gegen nativen Puffer renaturiert. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert. Der Überstand wurde in den im Folgenden beschriebenen Aktivitätstests analysiert.

### ***Nachweis der enzymatischen Aktivität***

Die enzymatische Aktivität von Caspase-3 wurde mithilfe des Caspase-3-spezifischen colorimetrischen Peptidsubstrats Ac-DEVD-pNA wie unter 2.2.3.12 beschrieben nachgewiesen. Wie in Abbildung 3.31 A dargestellt, ist die rekombinant aus den einzelnen Untereinheiten hergestellte Caspase-3 aktiv und spaltet das Peptidsubstrat. Die spezifische Aktivität entsprach etwa der von aktiver Caspase-3, die von der Firma Pharmingen ebenfalls in *E. coli* hergestellt und vertrieben wird, oder lag z. T. sogar darüber. Während die Caspase-3 der Firma Pharmingen innerhalb weniger Wochen nach Lagerung bei -80°C schnell an Aktivität verlor, war die im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Caspase-3 noch nach über einem Jahr trotz wiederholten Auftauens und Einfrierens in signifikantem Ausmaß aktiv.

Die separat renaturierten p12 und p17 Untereinheiten besaßen keine enzymatische Aktivität (Abb. 3.31 B). Gleichfalls war Procaspase-3, die wie unter 3.1.5 beschrieben als Substrat für Granzym B in *E. coli* exprimiert wurde, nach denaturierender Reinigung und Renaturierung nicht aktiv und konnte das Caspase-3 Peptidsubstrat nicht spalten (Abb. 3.31 C).

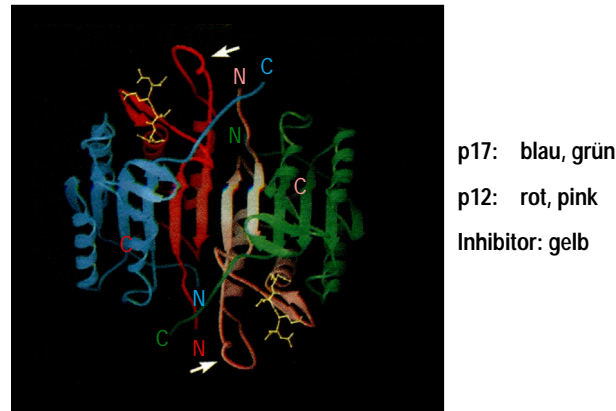


**Abbildung 3.31 Nachweis der enzymatischen Aktivität von rekonstituierter Caspase-3.** **A**, Die wie beschrieben aus den Untereinheiten renaturierte Caspase-3 wurde in den angegebenen Konzentrationen mit 200  $\mu$ M Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Farbentwicklung nach Spaltung des Substrats wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm bestimmt. Als Positivkontrolle wurde aktive Caspase-3 (Pharmingen) eingesetzt. **B**, Die separat renaturierten Untereinheiten p12 und p17 besitzen keine enzymatische Aktivität. Kontrolle: Substrat in Puffer ohne Protein. **C**, Procaspase-3, die zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B in *E. coli* wie unter 3.1.5 beschrieben exprimiert, gereinigt und renaturiert wurde, ist ebenfalls nicht aktiv und spaltet das Caspase-3-spezifische Peptidsubstrat nicht.

### 3.4.2 Expression verschiedener Caspase-3-Antikörper Fusionsproteine in *E. coli* und funktionelle Charakterisierung

Analog zu den in Abschnitt 3.3.2 beschriebenen Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen wurden entsprechende Proteine konstruiert, die sich von den beiden Exotoxin A- und Diphtherietoxin-Immuntoksinen ableiten und die anstelle von Granzym B jeweils eine der beiden Caspase-3 Untereinheiten enthalten. Das Ziel war dabei, eine der Caspase-3 Untereinheiten mit einer bakteriellen Translokationsdomäne und dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 zu fusionieren und Caspase-3 Aktivität durch gemeinsame Renaturierung des Fusionsproteins mit der jeweils komplementären Untereinheit zu rekonstituieren. Dabei war jedoch zu beachten, daß durch die Fusion von heterologen Proteindomänen an eine der Untereinheiten von Caspase-3 nicht die Enzymstruktur zerstört und damit die enzymatische Aktivität verloren wird. Als Grundlage für Überlegungen, an welchen Enden der Untereinheiten möglicherweise Fusionen ohne Verlust der Proteinstruktur toleriert werden,

stand die Kristallstruktur von aktiver Caspase-3 im Komplex mit einem Aldehyd-Peptid-inhibitor [Nicholson, 1997; Rotonda, 1996] zur Verfügung (Abb. 3.32).



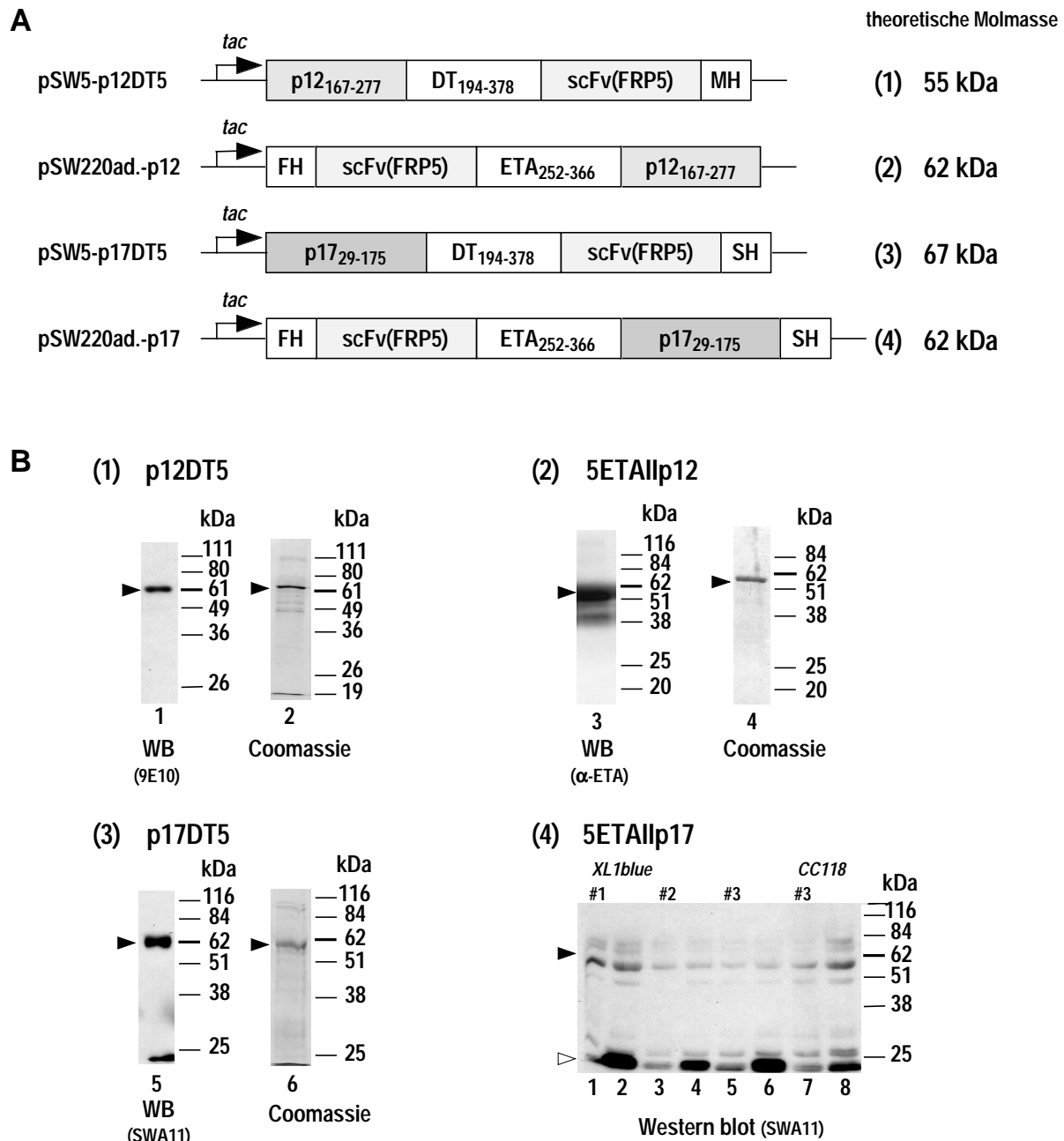
TIBS 1997, 22, 299-306

**Abbildung 3.32 Struktur von aktiver Caspase-3 im Komplex mit einem Tetrapeptid Aldehyd-Inhibitor** [Nicholson, 1997]. Die p17 Untereinheiten sind blau/grün dargestellt, die p12 Untereinheiten rot/pink, der Peptidinhibitor ist gelb abgebildet.

Da es jedoch schwierig war, zuverlässige Voraussagen darüber zu machen, an welchen Peptiden die Fusion heterologer Proteindomänen nicht zur Beeinflussung der Enzymstruktur führt, wurden alle vier theoretisch möglichen Fusionen wie in Abbildung 3.33 A gezeigt konstruiert.

In den bereits bestehenden Vektor pSW220ad., der die cDNA kodierend für den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 und die Translokationsdomäne von Exotoxin A (ETA) sowie ein Flag-Epitop und einen Hexahistidin-tag (FH) unter der Kontrolle des *tac*-Promotors enthält, wurde die cDNA der p12 oder p17 Untereinheit wie dargestellt und unter 2.1.4 beschrieben inseriert. Die resultierenden Plasmide pSW220 ad.[p12] und pSW220 ad.[p17sh] wurden durch Sequenzierung verifiziert. Zur Konstruktion von Fusionen mit den C-Termini der p12 und p17 Untereinheiten wurde im Expressionsplasmid pSW5[GrB-DT-5] die cDNA von Granzym B gegen die von p12 oder p17 ausgetauscht (2.1.4). Die Vektoren pSW5[p12-DT-5] und pSW5[p17-DT-5] kodieren neben p12 und p17 die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin (DT) und den „single chain“ Antikörper FRP5.

Die Konstrukte (1) bis (3) wurden in *E. coli* Xl1 blue überexprimiert und die rekombinanten Proteine über  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die gereinigten Proteine wurden in Coomassie gefärbten SDS-Gelen und im Western blot mit den in Abb. 3.33 B angegebenen Antikörpern nachgewiesen. Die molaren Massen stimmten mit den berechneten gut überein. p12-DT-5 (1) und 5-ETAII-p12 (2) konnten in Ausbeuten von ca. 1 bis 5 mg je Liter Expressionskultur gereinigt werden, p17-DT-5 (3) in einer geringeren Ausbeute von ca. 200 µg je Liter Expressionskultur.



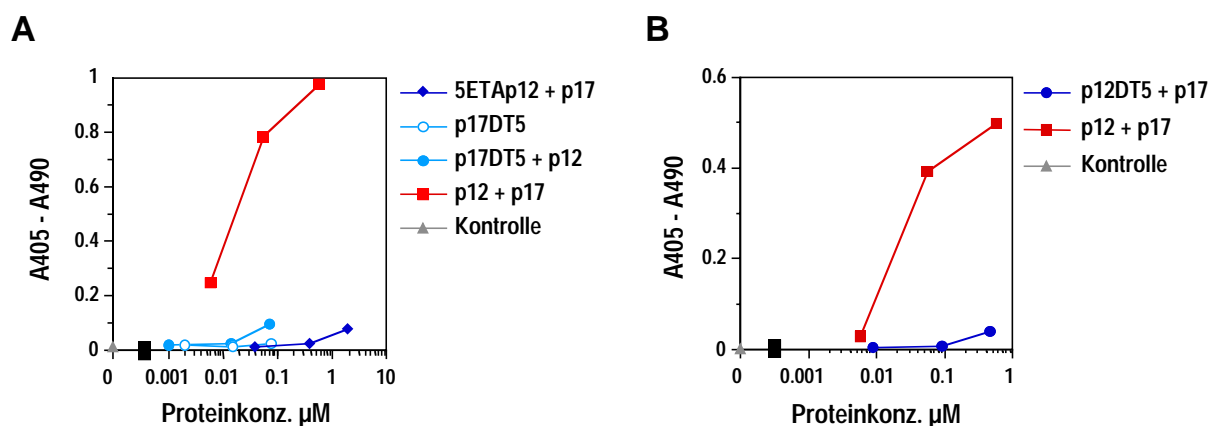
**Abbildung 3.33 Konstruktion, Expression und Reinigung verschiedener Immuntoxin-ähnlicher Fusionsproteine, die eine der beiden Caspase-3 Untereinheiten als Effektorfunktion enthalten.**

**A, Expressionskonstrukte zur Produktion der Proteine in *E. coli*.** Die Expressionsvektoren wurden wie im Text beschrieben konstruiert. Die kodierten Proteine enthalten die p12 oder p17 Untereinheit von Caspase-3, die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin (DT) oder Exotoxin A (ETA) sowie den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5). M: Myc-Epitop, F: Flag-Epitop, S: SWA11-Epitop, H: Hexahistidin-tag. **B, Western blots und Coomassie gefärbte SDS-Gele der gereinigten Proteine (1), (2) und (3).** Die Konstrukte wurden in *E. coli* XL1 blue überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluate wurden durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung bzw. Western blot analysiert. Die rekombinanten Proteine wurden im Western blot über die Epitop-tags mit den entsprechenden Antikörpern wie angegeben nachgewiesen. **Expressionsanalyse von Konstrukt (4).** Aliquots von Kulturen jeweils vor und nach Induktion der Proteinexpression für 2 Std. bei 30°C wurden in SDS-Probenpuffer lysiert und im Western blot auf die Expression von rekombinantem Protein untersucht. Es wurden Expressionskulturen aus verschiedenen Minipröp-Klonen in XL1 blue sowie eines Minipröp-Klons, der in CC118 retransformiert wurde, analysiert.

Dagegen war es nicht möglich, 5-ETAI-p17 (4) in *E. coli* XL1 blue oder CC118 zu exprimieren. Der in Abb. 3.33 B abgebildete Western blot zeigt Aliquots von Expressionskulturen jeweils vor und zwei Stunden nach Induktion der Proteinexpression bei 30°C. Es konnte lediglich ein niedermolekulares Abbauprodukt nachgewiesen werden (offener Pfeil), das durch IPTG induziert wurde und das aufgrund der molaren Masse der p17 Untereinheit ohne die fusionierten Proteindomänen zugeordnet werden könnte. Vollständiges 62 kDa Fusionsprotein (ausgefüllter Pfeil) konnte jedoch nicht detektiert werden. Die Variation der Expressionsbedingungen führte ebenfalls nicht zur Produktion des vollständigen Fusionsproteins (nicht gezeigt).

### Analyse der enzymatischen Aktivität

Die gereinigten Fusionsproteine wurden zusammen mit der jeweils komplementären Caspase-3 Untereinheit wie unter 2.2.3.7 beschrieben renaturiert. Dazu wurden wie im Fall der nicht-modifizierten p12 und p17 Untereinheiten zur Rekonstituierung von aktiver Caspase-3 äquimolare Mengen Fusionsprotein und p12 bzw. p17 gemischt, die zuvor gegen 6 M Guanidinium-Hydrochlorid dialysiert worden waren. Zur Rückfaltung des Proteins wurde das denaturierende Agens durch Dialyse entfernt. Ausgefallenes Protein wurde abzentrifugiert und der Überstand mithilfe des colorimetrischen Peptidsubstrats Ac-DEVD-pNA auf enzymatische Caspase-3 Aktivität untersucht. Während Caspase-3, die aus p12 und p17 hergestellt wurde, eine Farbentwicklung hervorrief, konnte keines der rekonstituierten Fusionsproteine das Peptidsubstrat spalten (Abb. 3.34 A und B). Die Fusion heterologer Proteindomänen an die N- oder C-Termini der beiden Caspase-3 Untereinheiten ist damit offenbar nicht ohne weiteres unter Erhalt der Enzymaktivität möglich.



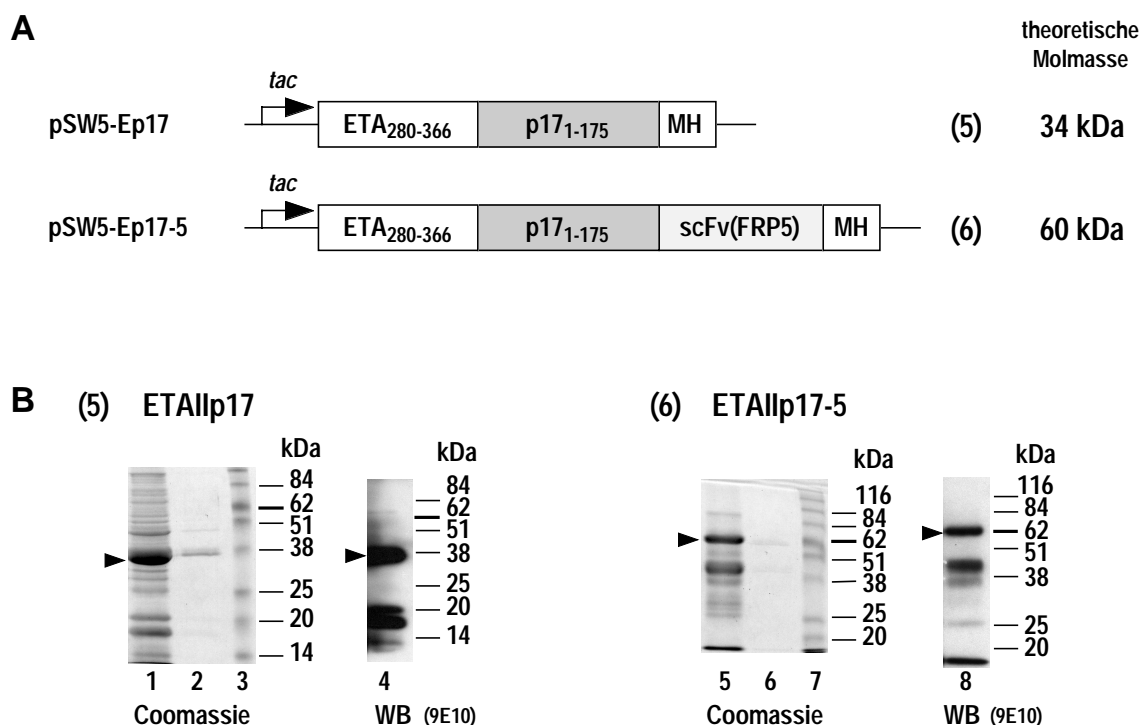
**Abbildung 3.34 Nachweis der enzymatischen Aktivität von 5-ETAI-p12, p17-DT-5 (A) und p12-DT-5 (B) nach Renaturierung mit der jeweils komplementären Caspase-3 Untereinheit.** Die gereinigten Fusionsproteine wurden nach 2.2.3.7 zusammen mit der jeweils komplementären Untereinheit renaturiert und zur Analyse der enzymatischen Aktivität mit dem Caspase-3-spezifischen colorimetrischen Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA inkubiert (2.2.3.12). Die Farbentwicklung wurde durch Messung der Extinktion bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm bestimmt. Als Positivkontrolle wurde aktive Caspase-3 (p12+p17) eingesetzt. Kontrolle: Substrat in Puffer ohne Protein.



### 3.4.3 Konstruktion und Expression modifizierter Caspase-3-Fusionsproteine

Der Konstruktion der in Abbildung 3.35 A dargestellten Fusionsproteine lag ursprünglich die Überlegung zugrunde, daß die verkürzte Translokationsdomäne von Exotoxin A (ETAII<sub>280-366</sub>) die Aufnahme des Proteins in das Zytoplasma von Zielzellen verbessern könnte. Aus Gründen der Klonierstrategie wurde ein Fusionsprotein so konstruiert, daß die p17 Caspase-3 Untereinheit zwischen die verkürzte ETAII-Domäne und den „single chain“ Antikörper FRP5 eingefügt wurde (6). Darüber hinaus wurde ebenfalls aus kloniertechnischen Gründen ein zweites Konstrukt hergestellt, das nur die verkürzte ETAII-Domäne am N-Terminus von p17, aber keinen „single chain“ Antikörper enthält (5). Beide Konstrukte kodieren außerdem am C-Terminus der rekombinanten Proteine ein Myc-Epitop und einen Hexahistidin-tag (MH). Die Ableitung der Expressionsplasmide pSW5[Ep17] und pSW5[Ep17-5] ist unter 2.1.4 detailliert beschrieben.

Beide Proteine konnten in *E. coli* XL1 blue überexprimiert werden und wurden über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. In den Eluatfraktionen wurden die rekombinanten Proteine durch SDS-PAGE und Coomassie Färbung sowie im Western blot mit anti-Myc 9E10 Antikörper nachgewiesen. Die molaren Massen stimmten mit den berechneten gut überein. Die Proteinausbeute betrug ca. 1 bis 2 mg gereinigtes Protein je Liter Expressionskultur.

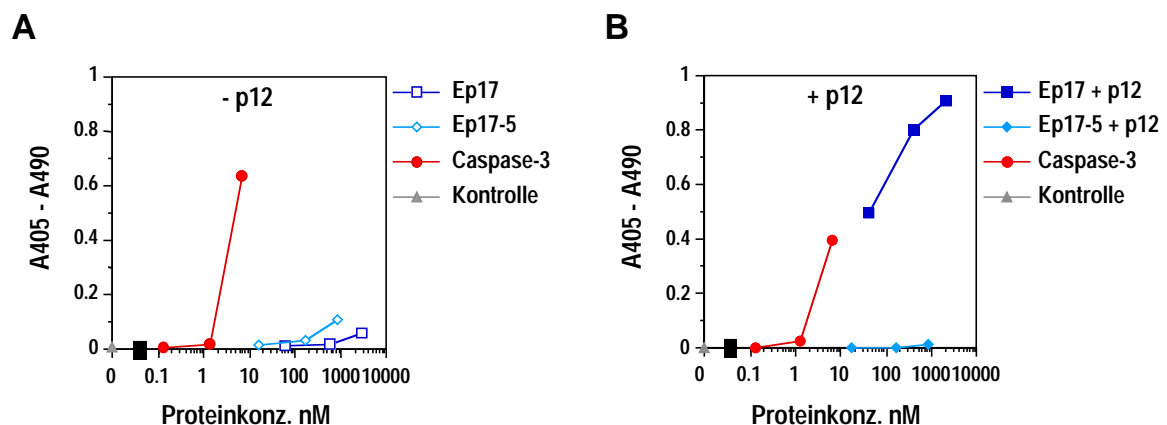


**Abbildung 3.35 Expression modifizierter p17-Fusionsproteine, die eine verkürzte Translokationsdomäne von Exotoxin A enthalten. A, Expressionskonstrukte.** Die Plasmide wurden wie im Text beschrieben konstruiert. **B, Coomassie gefärbte SDS-Gele und Western blots der gereinigten Proteine.** Die Konstrukte wurden in *E. coli* XL1 blue überexprimiert und unter denaturierenden Bedingungen über Ni<sup>2+</sup>-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluatfraktionen 1 (Spuren 1,5) und 2 (Spuren 2,4,6,8) wurden über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung sowie im Western blot mit anti-Myc 9E10 Antikörper analysiert. Spuren 3,7: Markerproteine.

### Analyse der enzymatischen Aktivität

Die gereinigten p17 Fusionsproteine wurden zusammen mit der p12 Caspase-3 Untereinheit wie zuvor und unter 2.2.3.7 beschrieben renaturiert. Im Ansatz, der Ep17-5 und p12 enthielt, fiel dabei sehr viel Protein aus, das durch Zentrifugation entfernt wurde. Die Proteinkonzentration wurde daraufhin im Überstand neu bestimmt. Durch Inkubation der renaturierten Proteine mit dem Caspase-3-spezifischen Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA wurde die enzymatische Aktivität analysiert. Wie in Abb. 3.36 A dargestellt, besitzen die ohne p12 renaturierten p17-Fusionen Ep17 und Ep17-5 keine enzymatische Aktivität. Durch Renaturierung von Ep17-5 zusammen mit der p12 Untereinheit entstand ebenfalls kein aktives Protein, das in der Lage war, das Peptidsubstrat zu spalten (Abb. 3.36 B). Dagegen zeigte Ep17 nach Rekonstituierung mit p12 signifikante proteolytische Aktivität gegenüber dem Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA, die zu einer deutlichen Gelbfärbung der Lösung führte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß es möglich ist, heterologe Proteindomänen an den N-Terminus der p17 Untereinheit von Caspase-3 zu fusionieren, ohne daß die Enzymaktivität im rekonstituierten Fusionsprotein Ep17+p12 verloren geht.

Beide Renaturierungsansätze, d.h. sowohl Ep17+p12 als auch Ep17-5 +p12 wurden auf potentielle zytotoxische Aktivität in einem MTT Proliferations-assay untersucht; es konnte jedoch kein zytotoxischer oder Wachstums-inhibierender Effekt beobachtet werden (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war allerdings nicht unerwartet, da das Ep17-5+p12 Fusionsprotein, das als Zellbindungsdomäne den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 besitzt, *in vitro* nicht enzymatisch aktiv ist. Andererseits verfügt das aktive Fusionsprotein Ep17+p12, das das Peptidsubstrat *in vitro* spalten konnte, über keine Zellbindungsdomäne, so daß eine Aufnahme in die Zellen nicht zu erwarten ist.



**Abbildung 3.36 Analyse der enzymatischen Aktivität von E-p17 und E-p17-5 nach Renaturierung mit p12.** Die gereinigten Proteine wurden wie beschrieben zusammen mit der p12 Untereinheit (B) oder zur Kontrolle alleine (A) renaturiert. Nach Abtrennen von ausgefallenem Protein wurde die enzymatische Aktivität mithilfe des colorimetrischen Peptidsubstrats Ac-DEVD-pNA wie zuvor bestimmt. Als Positivkontrolle wurde aktive Caspase-3 (Pharmingen) eingesetzt. Kontrolle: Substrat in Puffer ohne Protein.

### 3.4.4 Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1 bis 3.4.3

Enzymatisch aktive rekombinante Caspase-3 konnte durch Expression der beiden Untereinheiten p12 und p17 in *E. coli* und gemeinsame Rückfaltung der denaturierten Proteindomänen hergestellt werden. Um aktive Caspase-3 selektiv in ErbB2 überexprimierende Tumorzellen einzuschleusen, wurden verschiedene Fusionsproteine konstruiert, die jeweils eine der Caspase-3 Untereinheiten neben der Translokationsdomäne von Diphtherietoxin (DT) oder Exotoxin A (ETAII) und dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 enthalten. Die Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert; allerdings konnte kein vollständiges 5-ETAII-p17 Protein in *E. coli* hergestellt werden. Die gewonnenen Ergebnisse zur Expression und enzymatischen Aktivität der Fusionsproteine sind in Abb. 3.37 tabellarisch zusammengefaßt.

Beide p12 Fusionsproteine besaßen nach Renaturierung mit der p17 Untereinheit keine enzymatische Aktivität. Dagegen konnte aus einem p17-Fusionsprotein, das die Translokationsdomäne von Exotoxin A am N-Terminus enthält (Ep17), zusammen mit der p12 Untereinheit Caspase-3 Aktivität rekonstituiert werden. Die zusätzliche Fusion des „single chain“ Antikörpers FRP5 an den C-Terminus von p17 (Ep17-5) führte dagegen wieder zum Verlust der enzymatischen Aktivität.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Fusion heterologer Proteindomänen an die beiden Caspase-3 Untereinheiten Auswirkungen auf die Enzymstruktur und -aktivität hat. Am N-Terminus der p17 Untereinheit werden aber offenbar zusätzliche Peptidsequenzen unter Erhalt der enzymatischen Aktivität toleriert.

| Konstrukt     | Expression | enzymat. Aktivität<br>nach Renaturierung<br>mit p17 bzw. p12 |
|---------------|------------|--|
| (1) p12DT5    | +          | -  |
| (2) 5ETAIIp12 | +          | -  |
| (3) p17DT5    | +          | -  |
| (4) 5ETAIIp17 | -          | n.d.   |
| (5) Ep17      | +          | +  |
| (6) Ep17-5    | +          | -  |

**Abbildung 3.37 Zusammenfassung der Expressions- und Aktivitätsdaten der Caspase-3-Fusionsproteine, die in den oben beschriebenen Experimenten gewonnen wurden.**

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, rekombinantes humanes Granzym B herzustellen, das enzymatische Aktivität besitzt und zusammen mit Perforin oder einem funktionellen Äquivalent Apoptose in Zielzellen induziert. Darüber hinaus wurde das Verhalten des rekombinanten Proteins gegenüber Kulturen etablierter Tumorzelllinien in Abwesenheit von Perforin untersucht, und zwar insbesondere im Hinblick auf den zytotoxischen Effekt von Granzym B sowie die Zellbindungsaktivität der Protease und deren Internalisierungsverhalten. Diese Untersuchungen lieferten wichtige Ergebnisse für die Fragestellung, wie rekombinante Formen von Granzym B in neuen therapeutischen anti-Tumor Strategien eingesetzt werden könnten, um Tumorzellen durch die Induktion von Apoptose zu eliminieren. Um Granzym B selektiv gegen Tumorzellen zu richten, wurden Möglichkeiten untersucht, Granzym B unter Erhalt der enzymatischen Aktivität mit dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 zu fusionieren, der die selektive Bindung an und Aufnahme in ErbB2-überexprimierende Tumorzellen erlaubt. Als alternative pro-apoptotische Effektorfunktion in solchen bifunktionalen Antikörper-Fusionsproteinen wurden außerdem rekombinante Formen von aktiver Caspase-3 eingesetzt. Verschiedene Proteinpräparationen, die neben aktiver Caspase-3 den „single chain“ Antikörper FRP5 sowie eine bakterielle Translokationsdomäne als „endosome escape“ Funktion enthalten, wurden funktionell charakterisiert und insbesondere auf Erhalt der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 nach Fusion mit den heterologen Proteindomänen analysiert.

### 4.1 Produktion von rekombinantem, enzymatisch aktivem humanen Granzym B

Die Expression von rekombinantem, enzymatisch aktivem Granzym B ist mit zwei Schwierigkeiten verbunden: Einerseits stellt die heterologe Expression einer aktiven Protease ein generelles Problem dar, da das rekombinante Protein in seiner funktionellen Form durch unspezifische Proteolyse oder Proteolyse potentieller Substrate möglicherweise zytotoxisch im Wirtsorganismus wirkt. Bei der Expression von Granzym B im Besonderen besteht außerdem die Gefahr, daß das aktive Enzym zur Induktion von Apoptose in eukaryoten Hersteller-Organismen führt. Andererseits wird Granzym B im physiologischen Kontext durch ein Aktivierungsdipeptid am N-Terminus des Proenzym reguliert, dessen Abspaltung für die Bildung des aktiven Enzyms erforderlich ist [Pham, 1999; Smyth, 1995; Caputo, 1993]. Die ersten vier Aminosäuren des reifen Enzyms sind darüber hinaus in allen Granzymen sowohl des Menschen als auch in Nagern konserviert [Trapani, 2001], was darauf hindeutet, daß ein definierter N-Terminus im funktionellen Enzym notwendig ist bzw. Veränderungen am N-Terminus möglicherweise zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen.

Vor Beginn dieser Arbeit wurde die heterologe Expression von Granzym B nur in Säugerzellen nach transienter Transfektion beschrieben. Enzymatisch aktives Protein konnte in COS-Zellen mit einem Konstrukt hergestellt werden, in dem die Sequenz des Aktivierungsdipeptids aus der cDNA von wildtyp Granzym B deletiert wurde. Die Expression von enzymatisch aktivem Granzym B in Affen-Nierenfibroblasten führte in diesem Fall nicht zur Induktion von Apoptose, da das reife Enzym aufgrund des Sekretions-Signalpeptids in Membran-umschlossene Vesikel verpackt wurde, in denen es für die Zellen in inaktiver Form vorlag [Pinkoski, 1998]). Da die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen jedoch nur mit relativ geringer Proteinausbeute möglich ist, wurden in dieser Arbeit andere Expressions-

systeme untersucht, die schneller zur Produktion von Biomasse führen, um Granzym B in größeren Mengen im mg-Bereich herstellen zu können, was für eine mögliche therapeutische Verwendung erforderlich ist. Dazu wurden Expressionskonstrukte verwendet, die entweder die cDNA Sequenz der reifen Protease direkt anschließend an das ATG des Translationsstartpunkts enthalten (pSW5[GrB]; 3.1.4), so daß im rekombinanten Protein ein zusätzliches Methionin am N-Terminus vorhanden ist; oder die Fusionen von reifem Granzym B mit GST bzw. einem Sekretions-Signalpeptid kodieren (pGEX-4T1[Xa-GrB], pPIC9Δ[GrB], pPIC9[GrB]; 3.3.4 und 3.1.8), wobei das N-terminale Peptid anschließend *in vitro* (GST) oder *in vivo* (Signalpeptid) abgespalten wird, so daß reifes Granzym B mit unverändertem N-Terminus entsteht. Während GST-Fusionen auch nach Abspaltung des GST-Anteils kein enzymatisch aktives Granzym B lieferten, konnte Granzym B in der Hefe *Pichia pastoris* als lösliches Protein exprimiert und in den Kulturüberstand sekretiert werden, das enzymatische Aktivität besitzt und sowohl rekombinante Caspase-3 *in vitro* spaltet als auch nach intrazellulärer Applikation in HeLa Zellen Apoptose induziert. Der Vergleich der enzymatischen Aktivität der beiden Proteine, die mit den Konstrukten (1) und (2) in *Pichia pastoris* hergestellt wurden (3.1.8), bestätigte die Bedeutung eines definierten N-Terminus im reifen Enzym. Beide Konstrukte kodieren die Fusion von Granzym B mit dem Sekretions-Signalpeptid des  $\alpha$ -Faktor Proteins aus *S. cerevisiae*, das nach Ausschleusung des rekombinanten Proteins durch die *Pichia* Proteasen KEX2 und STE13 in zwei Schritten abgespalten wird. Die zweite Spaltung durch STE13 erfolgt jedoch z. T. nur unvollständig (Invitrogen *Pichia* Expression Kit Manual), so daß in diesem Fall am N-Terminus von reifem Granzym B ein zusätzliches Tetrapeptid vorhanden wäre. Im Gegensatz zu Konstrukt (1), das die vollständige vektor-kodierte Sequenz des Sekretions-Signalpeptids enthält, wurde daher in Konstrukt (2) die Sequenz des Tetrapeptids Glu-Ala-Glu-Ala deletiert, so daß nach Spaltung durch KEX2 direkt reifes Granzym B ohne weitere Aminosäuren am N-Terminus entsteht. Die deutlich geringere spezifische Aktivität von Granzym B, das mit Konstrukt (1) synthetisiert wurde, im Vergleich zu Protein, das mit Konstrukt (2) hergestellt wurde, kann so wahrscheinlich darauf zurückgeführt werden, daß die Abspaltung des Vektor-kodierten Tetrapeptids Glu-Ala-Glu-Ala durch die *Pichia* Protease STE13 tatsächlich nur unvollständig erfolgte und die zusätzlichen Aminosäuren am N-Terminus die korrekte Faltung der aktiven Protease und damit die enzymatische Aktivität beeinträchtigen.

Strukturdaten aus der Literatur unterstützen diese Vermutung. Ein dreidimensionales Modell des aktiven Zentrums von Granzym B zeigt, daß Aminosäurereste des N-Terminus Teil einer  $\beta$ -Faltblattstruktur sind, die im katalytisch aktiven Ser183 endet [Murphy, 1988]. Inzwischen wurde darüber hinaus die Kristallstruktur von Granzym B gelöst [Estebanez-Perpina, 2000; Waugh, 2000; Rotonda, 2001], in der der N-Terminus tatsächlich in das Protein hineingefaltet vorliegt und dort evtl. an intramolekularen Wechselwirkungen beteiligt ist.

Vergleichbare Ansätze zu der Strategie, die in dieser Arbeit zur Expression von enzymatisch aktivem Granzym B verwendet wurde, wurden inzwischen in der Literatur beschrieben und führten zur Produktion von murinem [Pham, 1998], Ratten- [Harris, 1998] sowie humanem Granzym B [Sun, 1999] in der Hefe *Pichia pastoris*.

In Übereinstimmung mit verschiedenen Berichten in der Literatur [Kummer, 1996; Smyth, 1995; Kummer, 1993] waren dagegen auch verschiedene eigene Versuche, funktionelles Granzym B in *E. coli* zu exprimieren, nicht erfolgreich. Ein Problem bei der unter 3.3.4 beschriebenen Herstellung von reifem Granzym B aus GST-Fusionen könnte möglicherweise in der Faltung des Proteins liegen. Da GST-GrB nur in Form unlöslicher „inclusion bodies“ aus *E. coli* Expressionskulturen gewonnen werden konnte, mußte das Protein durch Denaturieren solubilisiert und anschließend zurückgefaltet werden. Die Anwendung alternativer Rückfaltungsprotokolle oder die Fusion mit anderen Peptiden, wie z. B. mit dem Maltose-bindenden Protein [Bach, 2001], die möglicherweise die Expression als lösliches Protein erlau-

ben, könnten daher evtl. doch zur Herstellung von enzymatisch aktivem Granzym B in *E. coli* führen. Allerdings ist bei der Verwendung von *E. coli* als Expressionssystem zu berücksichtigen, daß Granzym B im physiologischen Kontext als stark glykosyliertes Protein sekretiert wird [Caputo, 1993]), so daß die Glykosylierung möglicherweise auch für die biologische Funktion wichtig sein könnte. Die ebenfalls von zytotoxischen Lymphozyten sekretierte Protease Granzym K konnte durch Expression des Proenzym in *E. coli* und anschließende Abspaltung des Aktivierungs-Dipeptids durch Cathepsin C *in vitro* in aktiver Form hergestellt werden [Wilharm, 1999]. Seit kurzem ist auch enzymatisch aktives Granzym B kommerziell erhältlich, das analog zu Granzym K in *E. coli* produziert wurde (D. Jenne, pers. Mitteilung). Die detaillierten Expressions- oder Rückfaltungsbedingungen wurden bisher allerdings nicht in der Literatur beschrieben. Möglicherweise erleichtert jedoch das Propeptid die Faltung des Proteins und erlaubt so die Herstellung des Enzyms in aktiver Form aus *E. coli* Expressionskulturen. Die Tatsache, daß die cDNA von reifem Granzym B in dieser Arbeit nicht in *E. coli* exprimiert werden konnte, d. h. daß mit pSW5[GrB] transformierte Expressionskulturen kein rekombinantes Protein synthetisieren, ist möglicherweise ebenfalls auf ein Problem der Proteinfaltung zurückzuführen oder evtl. auch auf die Toxizität des rekombinanten Proteins. Ein eindeutiger inhibitorischer Effekt auf das Wachstum von *E. coli* Kulturen nach Transformation mit dem Expressionsplasmid wurde allerdings nicht beobachtet.

## 4.2 Effekt von rekombinantem Granzym B auf Kulturen etablierter Tumorzelllinien

### *Extrazellulärer Effekt durch Proteolyse extrazellulärer Substrate*

Durch intrazelluläre Applikation von rekombinantem Granzym B, das in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt wurde, mit dem kationischen, Lipid-basierenden Transduktionsreagens BioPORTER kann Apoptose in HeLa Zellen induziert werden (3.2.2). Die rekombinante Protease alleine hat dagegen keinen zytotoxischen Effekt auf Kulturen etablierter Tumorzelllinien in Konzentrationen, die nach Komplexierung mit BioPORTER oder zusammen mit Perforin [Shi, 2000] zur Induktion von Apoptose führen. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, daß Kulturen adhärenter Gewebezellen nach Behandlung mit Granzym B in Konzentrationen ab 5 µg/ml und bei relativ langen Inkubationszeiten von 16 Stunden auffallende morphologische Veränderungen zeigen, die in Abwesenheit von Perforin oder einem funktionellen Äquivalent eintreten (3.2.5). Diese morphologischen Veränderungen führen zum Abkugeln der Zellen und partiellen Ablösen von der Kulturschale und sind mit dem Verlust der Proliferation und Zelltod verbunden (3.2.3). Sie werden durch Granzym B-Aktivität in Konzentrations-abhängiger Weise hervorgerufen; eine enzymatisch inaktive Mutante GrB S183A (oder die Inhibierung der enzymatischen Aktivität von Granzym B mit dem Granzym B-spezifischen Peptid-Inhibitor Ac-IETD-CHO) beeinflußt dagegen Proliferation und Morphologie von HeLa und A-431 Zellen nicht (Abb. 3.14, 3.15).

Der beobachtete Effekt ist aber nicht darauf zurückzuführen, daß Granzym B in hoher Konzentration auch in Abwesenheit von Perforin-Aktivität in das Zytoplasma von Zellen eindringen kann, da in Lokalisations-Experimenten gezeigt werden konnte, daß Granzym B zwar sehr schnell (innerhalb von 10 Minuten) in HeLa Zellen internalisiert, aber in vesikulären Strukturen eingeschlossen ist (3.2.4). Diese Beobachtung stimmt mit Berichten in der Literatur überein, die die spezifische Bindung von Granzym B an Zellen und Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endozytose beschreiben; die Induktion von Apoptose erfordert jedoch Perforin oder ein anderes endosomolytisches Agens zur Freisetzung der Protease aus

den Endosom-ähnlichen Vesikeln in das Zytoplasma [Pinkoski, 1998; Shi, 1997; Froelich, 1996b]. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimenten zum Nachweis der intrazellulären Lokalisation von rekombinantem Granzym B kann nicht ausgeschlossen werden, daß Granzym B in sehr geringer Konzentration, die unterhalb der Nachweisgrenze von Immunfluoreszenz-Färbungen liegt, doch aus den Membranvesikeln entweichen kann und als freies Enzym im Zytoplasma aktiv ist, das möglicherweise für die Aktivierung von Caspasen ausreichend sein und so Apoptose-Signalwege intrazellulär aktivieren könnte. Die Zellen zeigen jedoch nach Behandlung mit Granzym B zunächst keine typische apoptotische Morphologie; sie nehmen zwar eine kugelförmige Gestalt an und verlieren partiell den Kontakt zueinander wie auch zum Kultursubstrat, die Abschnürung von „apoptotic bodies“ und Fragmentierung der Zelle kann aber nach Behandlung mit Granzym B über Nacht nicht beobachtet werden. Die morphologischen Veränderungen, die durch Granzym B hervorgerufen werden, sind darüber hinaus reversibel nach Entfernen des rekombinanten Proteins: Während die Langzeitbehandlung von HeLa Zellen über mehrere Tage zum Erhalt der kugeligen Morphologie und Zytostase bzw. Zelltod führt (3.2.3 Abb. 3.12 und 3.2.5 Abb. 3.14), nehmen die Zellen nach Behandlung mit Granzym B über Nacht und Entfernen der Protease durch Waschen bereits nach kurzer Zeit (30 Minuten) wieder ihre normale ausgestreckte Morphologie an und proliferieren anschließend ununterscheidbar von nicht-behandelten Kontroll-Zellen (Abb. 3.16). Dies läßt die Vermutung zu, daß Granzym B in relativ hohen Konzentrationen auch extrazellulär auf Zellen einwirken und Komponenten der extrazellulären Matrix zerstören oder Proteine, die am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind, angreifen könnte. In verschiedenen Zelllinien konnten nach Langzeitbehandlung mit hohen Granzym B-Konzentrationen (20 µg/ml) der Verlust der mitochondrialen Stoffwechselaktivität bzw. Zytotoxizität in MTT Proliferations-assays sowie verschiedene Anzeichen von apoptotischem Zelltod wie DNA-Fragmentierung, Kernfragmentierung und Spaltung endogener Procaspase-3 nachgewiesen werden (3.2.3 Abb. 3.12). Neben der direkten Induktion von Apoptose über den „klassischen“ Granzym B / Perforin Weg stellt dieser Effekt damit einen neuen extrazellulären Wirkmechanismus von Granzym B dar, der ebenfalls zur Induktion von Apoptose, jedoch über einen indirekten Mechanismus und Zelltod durch Anoikis führt.

Die Spaltung von Komponenten der extrazellulären Matrix durch Granzym B wurde in der Literatur in einem klinischen Zusammenhang beschrieben: Das Proteoglykan Aggrecan, das den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix von Knorpelzellen bildet, kann als Substrat von Granzym B gespalten werden, was zum Abbau der Knorpelsubstanz beiträgt und eine Rolle bei rheumatoider Arthritis spielt [Froelich, 1993; Runday, 2001]. Über RT-PCR konnte Aggrecan mRNA in HeLa Zellen nachgewiesen werden, nicht jedoch in den übrigen untersuchten humanen Tumorzelllinien (3.2.6 Abb. 3.17). Damit konnte Aggrecan als ein mögliches Zielprotein für Granzym B in der extrazellulären Matrix von HeLa Zellen identifiziert werden; die Tatsache, daß andere Zelllinien, die wie HeLa Zellen ebenfalls nach Behandlung mit Granzym B morphologische Veränderungen zeigen, die langfristig zum Zelltod führen, keine Aggrecan mRNA aufweisen, deutet jedoch auf die Existenz weiterer extrazellulärer Granzym B-Substrate hin.

In Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde die Granzym B Konzentration in Gelenkflüssigkeit mithilfe eines ELISA bestimmt und zeigte deutlich erhöhte Werte von ca. 3 ng/ml [Tak, 1999] im Vergleich zu einer mittleren normalen Serumkonzentration in gesunden Individuen von 30 pg/ml [Spaeny-Dekking, 1998]. Die lokale Konzentration an endogenem Granzym B nach Degranulierung von zytotoxischen T-Lymphozyten ist dagegen nicht bekannt. *In vitro* wurden fünf Stunden nach Stimulierung der Degranulierung im Überstand von zytotoxischen T-Lymphozyten Konzentrationen im Bereich von 25 ng/ml gemessen [Spaeny-Dekking, 1998]. Die für die hier gezeigten Experimente verwendeten Granzym B-Konzen-

trationen liegen wesentlich über diesen Werten; inwiefern der beobachtete extrazelluläre Effekt daher physiologisch relevant ist, müßte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

### ***Bindung von rekombinantem Granzym B an Tumorzellen und Rezeptor-vermittelte Endozytose als Voraussetzung für die Spaltung intrazellulärer Substrate***

Der „klassische“ intrazelluläre Effekt von Granzym B, der zur Aktivierung von Caspasen durch Granzym B und Induktion von Apoptose führt, wird nach Perforin-vermittelter Internalisierung der Protease in Zielzellen ausgelöst. Endogenes, aus NK-Zelllinien gereinigtes Granzym B wird dabei in Abwesenheit von Perforin in vesikuläre Strukturen in Zellen aufgenommen, und Perforin dient offenbar als endosomolytisches Agens zur Freisetzung von Granzym B in das Zytoplasma der Zellen [Pinkoski, 1998; Shi, 1997; Froelich, 1996b]. Übereinstimmend mit diesen Berichten aus der Literatur bindet das im Rahmen dieser Arbeit hergestellte rekombinante Granzym B ebenfalls an Zellen verschiedener Tumorzelllinien und wird in diese Zellen schnell in vesikuläre Strukturen aufgenommen (3.2.4), aus denen es nicht in das Zytoplasma entweichen kann. Die intrazelluläre Applikation in HeLa Zellen mithilfe des synthetischen Transduktionsreagens BioPORTER führte dagegen zur Induktion von Apoptose in den behandelten Zellen (3.2.2). Das in der Hefe *Pichia pastoris* heterolog exprimierte Granzym B ist damit wie endogenes, aus NK-Zellen gereinigtes Granzym B vollständig funktional.

Der Mannose-6-Phosphat- / „insulin-like growth factor II“ (M6Ph/IGFII) Rezeptor wurde als ein Zelloberflächenrezeptor identifiziert, an den endogenes Granzym B über eine Mannose-6-Phosphat-Modifikation spezifisch bindet und über den es in Zellen aufgenommen wird [Motyka, 2000]. In einer anderen Arbeit wurde darüber hinaus die Internalisierung von Granzym B über Mikropinozytose neben der durch den M6Ph/IGFII Rezeptor vermittelten Endozytose beschrieben [Trapani, 2003]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente deuten ebenfalls darauf hin, daß die Internalisierung von Granzym B in Abhängigkeit einer posttranslationalen Modifizierung der Protease erfolgt: Aus verschiedenen *Pichia* Expressionskulturen wurde rekombinantes Protein erhalten, das vergleichbare enzymatische Aktivität besitzt, sich jedoch hinsichtlich des Internalisierungsverhaltens unterscheidet. Während Granzym B aus einer Expressionskultur wie unter 3.2.4 gezeigt innerhalb von 10 Minuten in HeLa Zellen aufgenommen wird (Abb. 3.13), konnte mit einer anderen Proteinpräparation weder Bindung an Zellen noch intrazelluläres Protein nach unterschiedlichen Inkubationszeiten nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Zellbindungsaktivität ist daher offenbar unabhängig von der enzymatischen Aktivität und wird weder durch die Aminosäuresequenz noch durch die Proteinfaltung festgelegt, da andernfalls mit dem Verlust der Zellbindungsaktivität auch der Verlust der enzymatischen Aktivität (Proteinfaltung) oder das Auftreten eines Degradationsprodukts (Aminosäuresequenz) zu erwarten wäre. Die Bindung von rekombinantem Granzym B an Zellen wie auch die Internalisierung in diese Zellen konnte jedoch in dieser Arbeit nicht oder nur unwesentlich durch Mannose-6-Phosphat inhibiert werden (Abb. 3.13), was mit den Ergebnissen von Trapani et al. [Trapani, 2003] übereinstimmt. Möglicherweise vermittelt daher auch eine andere posttranslationale Modifikation als ein Mannose-6-Phosphat-Rest die Bindung von Granzym B an Zellen. Obwohl die Expressionskulturen im Prinzip unter vergleichbaren Bedingungen kultiviert wurden (Beimpfen der Kultur mit gleichen Volumina Glycerinkultur, Induktion der Proteinexpression zum gleichen Zeitpunkt und für die gleiche Zeitspanne), unterschieden sich die Kulturen, die zellbindendes und nicht-bindendes Granzym B synthetisierten, wahrscheinlich z. B. hinsichtlich der Zelldichte (oder des pH Werts, des Nährstoffgehalts des Mediums etc.), die Einfluß auf das Glykosylierungsmuster heterolog exprimierter, rekombinanter Proteine haben könnte. Insbe-



sondere im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Anwendung von Granzym B wären rekombinante Formen der Protease von Interesse, die nicht unselektiv in Zellen aufgenommen werden. In weiterführenden Untersuchungen müßten daher Expressionsbedingungen identifiziert werden, die die Produktion von enzymatisch aktivem Granzym B erlauben, das jedoch nicht die für die Zellbindung verantwortliche(n) posttranslationale(n) Modifizierung(en) trägt.

Unabhängig von der unselektiven Aufnahme von Granzym B in verschiedene Tumorzelllinien bleibt die Protease jedoch inaktiv in Membran-umschlossenen Vesikeln, aus denen sie ohne Perforin oder eine vergleichbare endosomolytische Aktivität nicht in das Zytoplasma der Zellen eindringen kann. Diese Internalisierung in Zellen ist daher nicht mit der Induktion von Apoptose verbunden. Durch Fusion von Granzym B mit einem Tumorzell-spezifischen Antikörperfragment, das die selektive und hochaffine Bindung an Tumorzellen erlaubt, könnte Granzym B dennoch überwiegend selektiv in Tumorzellen appliziert werden. Verfügt das Fusionsprotein außerdem über eine Möglichkeit, aus dem Endosom ins Zytoplasma zu gelangen, so könnte dies trotzdem die selektive Induktion von Apoptose erlauben (vgl. 4.3).

#### **4.3 Granzym B als Effektorfunktion für Tumorzell-spezifische therapeutisch einsetzbare Moleküle**

##### ***Theoretische Überlegungen zur Eignung von Granzym B als pro-apoptotische Effektorfunktion***

Die Serin-Protease Granzym B fungiert zusammen mit Perforin als ein physiologischer, sehr effizienter Abwehrmechanismus des Immunsystems gegen Tumorzellen sowie körperfremde oder Virus-infizierte Zellen. Aus mehreren Gründen erscheinen rekombinante Formen von Granzym B ebenfalls sehr erfolgversprechend für den Einsatz in neuen therapeutischen anti-Tumor Strategien, die darauf zielen, Tumorzellen durch direkte Induktion von Apoptose zu eliminieren.

Ein generelles Problem bei der Applikation von Proteinen als therapeutischen Substanzen besteht darin, daß die relativ großen Moleküle schlecht in Zellen aufgenommen werden, so daß z. B. im Vergleich zu gängigen Zytostatika, die eine wesentlich geringere Molmasse und Größe besitzen, nur relativ geringe intrazelluläre Konzentrationen erreicht werden können. Als Enzym bietet Granzym B jedoch den Vorteil, daß katalytische Mengen in Zielzellen ausreichen sollten, um einen therapeutischen, zytotoxischen Effekt hervorzurufen. Die Aktivierung von Caspasen durch Granzym B kann darüber hinaus in einem feedback-Mechanismus zu einer vielfachen Amplifizierung des Apoptose-Signals führen.

Im Gegensatz zu konventionellen Chemotherapeutika wie auch zu verschiedenen neueren therapeutischen Ansätzen zur Aktivierung von Apoptose-Signalwegen z. B. durch Trail wirkt Granzym B darüber hinaus am unteren Effektorende der Apoptose-Signalwege und aktiviert diese damit den meisten Regulationsmechanismen nachgeordnet. Die in Tumorzellen beobachteten Resistenzmechanismen, die die Induktion von Apoptose durch physiologische Signale wie auch durch therapeutische Substanzen verhindern (wie z. B. Mutationen in p53 oder die Überexpression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub>; [Igney, 2002; Johnstone, 2002]), blockieren damit die Induktion von Apoptose durch Granzym B wahrscheinlich nicht. Die Überexpression von Proteinen der Familie der IAPs, die die Aktivität von Caspasen inhibieren [Deveraux, 1999] stellt einen Resistenzmechanismus in Tumorzellen dar, der Apoptose-Signalwege am unteren Effektorende blockiert. Durch direkte Proteolyse von Caspase-Substraten wie ICAD oder auch Bid wirkt Granzym B jedoch selber quasi als aktive

Effektor-Caspase und kann so wahrscheinlich auch in Tumorzellen Apoptose initiieren, die IAPs überexprimieren. Granzym B besitzt damit auch den Vorteil, daß es verschiedene Zielproteine angreift und so an verschiedenen Punkten in Apoptose-Signalwege eingreifen und diese aktivieren kann. Auch bei Blockierung eines Signalwegs kann apoptotischer Zelltod daher trotzdem ausgelöst werden [Barry, 2002]. Die Induktion von Apoptose durch Granzym B wurde z. B. selbst bei Blockierung der Aktivität aller zellulärer Caspasen durch den allgemeinen Caspase-Inhibitor zVAD-fmk beobachtet [Pinkoski, 2000; Thomas, 2000]. Die Inhibierung Granzym B-vermittelter Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 wurde bisher in der Literatur widersprüchlich beschrieben [Alimonti, 2001; Pinkoski, 2001; Davis, 2000; Sutton, 2000]; inwiefern die experimentellen Bedingungen, die zur Überexpression von Bcl-2 in den beschriebenen Zellkultur-Experimenten führen (Transfektion von Zellen mit Konstrukten, die meist sehr starke virale Promotoren enthalten), mit der physiologischen Situation in Bcl-2 überexprimierenden Tumorzellen vergleichbar sind, ist jedoch fraglich. Es kann daher zwar nicht ausgeschlossen werden, daß die Überexpression von Bcl-2 Tumorzellen Resistenz gegenüber Granzym B verleiht; wahrscheinlich kann Granzym B jedoch auch in solchen Zellen, möglicherweise mit zeitlicher Verzögerung, Apoptose induzieren [Russell, 2002].

Obwohl Granzym B damit theoretisch ein sehr potentes Molekül zur Induktion von Apoptose auch in solchen Tumorzellen darstellt, in denen sich Apoptose-Resistenzmechanismen entwickelt haben, entgehen Tumorzellen dennoch der Eliminierung durch zytotoxische T-Lymphozyten und NK-Zellen des Immunsystems. Dies wird jedoch meist dadurch erreicht, daß Tumorzellen die Erkennung durch Immuneffektorzellen vermeiden. Der Verlust der Expression funktioneller MHC-Moleküle durch Tumorzellen verhindert z. B. die effiziente Präsentation von Tumorantigenen oder das Fehlen kostimulatorischer Moleküle die Aktivierung von T-Lymphozyten nach Antigenerkennung [Doyle, 1985; Gimmi, 1993]. Daher werden verschiedene Ansätze verfolgt, um die an sich sehr effizienten Effektorzellen des Immunsystems mithilfe chimärer T-Zell Rezeptoren trotzdem und gezielt gegen Tumorzellen zu richten (Übersicht: [Uherek, 2001]). Solche chimären Rezeptoren binden anstelle von MHC-Molekülen direkt an Tumor-assoziierte Antigene auf der Zelloberfläche und werden durch Antigenbindung aktiviert, was u. a. die Sekretion der zytotoxischen Vesikel zur Folge hat. Probleme solcher Ansätze bestehen jedoch einerseits im Gentransfer der für die chimären Rezeptoren kodierenden DNA-Konstrukte, andererseits in der Verwendung autologer oder allogener Zellen, die entweder für jeden Patienten individuell transfiziert werden müssen oder im Patienten als fremd erkannt und ihrerseits durch das Immunsystem angegriffen werden. Die gezielte therapeutische Applikation von Granzym B als einem der Effektormoleküle dieser Immuneffektorzellen in Tumorzellen ist daher eine theoretisch interessante wie vielversprechende neue Strategie zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Der einzige bekannte humane Inhibitor, der die enzymatische Aktivität von Granzym B spezifisch und effizient hemmt, ist der Proteinase Inhibitor 9 (PI-9). Neue Arbeiten zeigen, daß verschiedene Tumorzelllinien von Melanomen, Mamma-, Cervix- oder Colonkarzinomen [Medema, 2001] sowie primäre Tumorzellen von Patienten mit non-Hodgkin- und Hodgkin-Lymphomen [Bladergroen, 2001] PI-9 exprimieren, möglicherweise als einen weiteren Mechanismus, der Immunüberwachung zu entgehen. Inwiefern die Expression von PI-9 Tumorzellen tatsächlich Resistenz gegenüber therapeutisch applizierten Granzym B-Derivaten verleiht, müßte in weiterführenden Experimenten untersucht werden und ist wahrscheinlich eine Frage der relativen intrazellulären Konzentrationen. Vorläufige neue Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen jedoch, daß die Induktion von Apoptose durch Granzym B in Tumorzelllinien, die PI-9 mRNA enthalten und daher wahrscheinlich auch PI-9 Protein exprimieren, zumindest *in vitro* möglich ist (B. Dälken, unveröffentlicht).

### **Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Granzym B-Antikörper Fusionsproteinen**

Die selektive Applikation von Granzym B als Apoptose-induzierende Effektorfunktion in Tumorzellen erfordert zwei weitere funktionelle Aktivitäten, die einerseits die spezifische Bindung des Proteins an Tumorzellen vermitteln und andererseits die Aufnahme in das Zytoplasma von Zielzellen gewährleisten.

Bakterielle Toxine wie Exotoxin A oder Diphtherietoxin sind solche hochspezialisierten Moleküle, die diese drei Aktivitäten in einem Polypeptid enthalten [Kreitman, 1999]: Eine Zellbindungsdomäne erlaubt die Bindung an Zielzellen sowie die Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endozytose, eine sogenannte Translokationsdomäne fördert den Übergang der toxischen Domäne aus dem Endosom ins Zytoplasma, wo die toxische Domäne schließlich als enzymatische Aktivität die Proteinsynthese der Zelle durch ADP-Ribosylierung von Elongationsfaktor 2 blockiert. Im Granzym B/Perforin-System sind diese drei Funktionalitäten quasi auf zwei Proteine verteilt: Während Granzym B an Zellen bindet und in Endosomen-ähnliche Vesikel aufgenommen wird, vermittelt Perforin die Freisetzung der Protease ins Zytoplasma, wo die enzymatische Aktivität von Granzym B Apoptose-Signalwege aktiviert und so apoptotischen Zelltod auslöst. An welche Zielmoleküle Granzym B auf der Oberfläche von Zielzellen bindet und welche Strukturkomponenten von Granzym B dafür verantwortlich sind, ist bisher jedoch noch nicht abschließend geklärt.

In Kombination beider Strategien wurden im Rahmen dieser Arbeit Fusionsproteine konstruiert, die neben dem Polypeptid von reifem, enzymatisch aktivem Granzym B einen „single chain“ Antikörper zur selektiven Bindung an ein Tumor-assoziiertes Antigen sowie außerdem eine bakterielle Translokationsdomäne als „endosome escape“ Funktion enthalten (3.3.2). Für die selektive und hochaffine Bindung an Tumorzellen stand der ErbB2-spezifische „single chain“ Antikörper FRP5 (scFv(FRP5)) zur Verfügung [Wels, 1992], der bereits in verschiedenen therapeutischen Ansätzen erfolgreich als Tumorzell-spezifische Zellbindungsdomäne eingesetzt wurde [Rohrbach, 2000; Maurer-Gebhard, 1998; Uherek, 1998a; Gerstmayer, 1997b].

Zwei mögliche Granzym B-Antikörper Fusionsproteine wurden für die Expression in der Hefe *Pichia pastoris* konstruiert, die Granzym B, die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin sowie den „single chain“ Antikörper FRP5 oder nur Granzym B und scFv(FRP5) enthalten (3.3.3). In beiden Fällen wurden die cDNA Sequenzen der einzelnen Proteindomänen direkt aneinander fusioniert. Beide Proteine konnten jedoch nur mit sehr geringer Ausbeute in *Pichia pastoris* hergestellt werden (3.3.3 und vgl. 4.4), die nur eine partielle funktionelle Charakterisierung der rekombinanten Proteine erlaubte, zumal Versuche, die Proteine aus dem Überstand von Expressionskulturen zu reinigen, nicht erfolgreich waren. Mit konzentriertem Kulturüberstand konnten jedoch Daten gewonnen werden, die darauf hindeuten, daß die enzymatische Aktivität von Granzym B nach Fusion des scFv(FRP5) als heterologer Proteindomäne an den C-Terminus der Protease erhalten bleibt (3.3.3 Abb. 3.22). Ein FACS-Experiment weist darauf hin, daß auch der „single chain“ Antikörper in GrB-5 funktional ist und an ErbB2 exprimierende Zellen bindet (Abb. 3.23).

Verschiedene Versuche, Granzym B-scFv(FRP5) Fusionsproteine mit den Translokationsdomänen von Diphtherietoxin oder Exotoxin A in *E. coli* zu exprimieren, waren nicht erfolgreich, da kein Protein hergestellt werden konnte, das Granzym B-Aktivität besaß (3.3.4 und nicht gezeigt). Ein Ansatz, *in vitro* biotinyliertes Granzym B aus *Pichia pastoris* mit einem in *E. coli* hergestellten Fusionsprotein aus core-Streptavidin und scFv(FRP5) zu komplexieren und so Granzym B auf Proteinebene mit scFv(FRP5) zu kombinieren, führte ebenfalls nicht zum gewünschten Effekt, da die Komplexe nicht in ErbB2-exprimierende Zellen aufgenommen wurden (3.3.5). Ein möglicher Grund hierfür wäre die Bildung hochmolekularer, quervernetzter Aggregate durch mehrfach-biotinyliertes Granzym B, die evtl. nicht in die Zellen aufgenommen werden können. Wie Granzym B *in vitro* biotinyliertes

EGFP (enhanced green fluorescent protein) konnte aber nach Komplexierung mit SA-5 in Zellen internalisieren und intrazellulär als gleichmäßige Grünfärbung des Zytoplasmas durch CLSM nachgewiesen werden (B. Dälken, unveröffentlicht).

Im Rahmen dieser Arbeit war es damit nicht möglich, funktionelle Granzym B-Antikörper Fusionsproteine herzustellen und Granzym B so selektiv in Tumorzellen zu applizieren. Die gewonnenen Ergebnisse liefern jedoch einen wichtigen Hinweis darauf, wie rekombinante Formen von Granzym B durch Fusion mit einem Antikörperfragment als therapeutische Moleküle gezielt gegen Tumorzellen gerichtet werden könnten, um in diesen Zellen selektiv Apoptose zu induzieren: Einerseits konnte durch Expression der cDNA von reifem Granzym B in der Hefe *Pichia pastoris* enzymatisch aktives, nicht-modifiziertes Protein hergestellt werden. Während heterologe Peptidsequenzen am N-Terminus der Protease zum partiellen Verlust der enzymatischen Aktivität führten, konnte andererseits der „single chain“ Antikörper FRP5 unter Erhalt der Enzymaktivität an den C-Terminus von Granzym B fusioniert werden. Die Etablierung geeigneter Expressionsbedingungen, die über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Variationen hinausgehen, oder die Modifizierung der Expressionskonstrukte z. B. durch Einfügen einer Linker-Sequenz zwischen die einzelnen funktionellen Domänen wären Gegenstand weiterführender Arbeiten, um die Herstellung rekombinanter Granzym B-Antikörper Fusionsproteine basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit zu ermöglichen.

Inwiefern die intrinsische Zellbindungsaktivität von Granzym B mit diesem Ansatz interferiert, d. h. auch zur unselektiven Induktion von Apoptose durch Granzym B-Fusionsproteine führt, wie auch die Notwendigkeit einer „endosome escape“ Funktion für die Funktionalität solcher Granzym B-Antikörper Fusionen müßte in weiteren Untersuchungen mit rekombinanten Fusionsproteinen experimentell geklärt werden. Neue Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, daß ein modifiziertes GrB-5-Konstrukt, in dem Granzym B und der ErbB2-spezifische „single chain“ Antikörper FRP5 über einen ausgedehnten Glycin-Serin-Linker verbunden sind, zu einer wesentlich höheren Expressionsrate in *Pichia pastoris* und höheren Proteinausbeuten nach Reinigung des rekombinanten Proteins führt (vgl. 4.4). Dieses Fusionsprotein induziert bei gleichzeitiger Behandlung von Zellen mit Chloroquin als endosomolytischem Agens selektiv Apoptose in verschiedenen ErbB2-exprimierenden Tumorzelllinien, während nicht modifiziertes Granzym B zusammen mit Chloroquin keine zytotoxische Wirkung auf diese Zellen hat (B. Dälken, unveröffentlicht). Diese Daten bestätigen damit das in dieser Arbeit verfolgte Konzept und zeigen, daß es möglich ist, Granzym B durch Fusion mit dem „single chain“ Antikörper FRP5 gezielt in ErbB2-positive Tumorzellen zu applizieren; die Induktion von Apoptose erfordert jedoch Chloroquin als Agens, das Endosomen zerstört und so die Freisetzung von Granzym B ins Zytoplasma der Zellen gewährleistet. Ob die Funktion von Chloroquin durch die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin ersetzt werden kann, so daß Zellbindungs-, Translokations- und toxische Aktivität wie in dem in dieser Arbeit verfolgten Konzept vorgesehen in einem Polypeptid enthalten sind, müßte in einem nächsten Schritt untersucht werden.

#### **4.4 Das Konzept multifunktioneller Fusionsproteine als „maßgeschneiderte“ therapeutische Werkzeuge**

Das Konzept multifunktioneller Fusionsproteine, das auf der Kombination verschiedener funktioneller Aktivitäten in einem rekombinanten Protein basiert, erlaubt theoretisch die Herstellung „maßgeschneiderter“ Protein-„Werkzeuge“ für unterschiedliche Anwendungszwecke. So einfach und vielversprechend dieses Konzept in der Theorie erscheint, so

schwierig gestaltet sich jedoch häufig die praktische Umsetzung. Bei der Konstruktion rekombinanter Fusionsproteine ist zu berücksichtigen, daß Veränderungen der physiologisch aktiven Formen von Proteinen zum Verlust der nativen Proteinfaltung und daraus resultierend zum Verlust der Aktivität führen können. Dies gilt einerseits z. B. für die Deletion von Proteindomänen oder Peptidsequenzen. Die Prodomäne eines Enzyms, die im physiologischen Kontext zur Aktivierung des Proteins abgespalten wird, kann z. B. zunächst für die korrekte Faltung des Proteins erforderlich sein [Lilie, 1998]. Evtl. spielt auch das Aktivierungsdipeptid von Granzym B eine Rolle bei der korrekten Faltung der Protease, was eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Expression der cDNA von reifem Granzym B in *E. coli* nicht möglich war (3.1.4 Abb. 3.2). Andererseits können sich die einzelnen Fusionspartner sterisch oder durch intramolekulare Interaktionen gegenseitig beeinflussen, was die Zerstörung der nativen Konformation der individuellen Proteindomänen im Fusionsprotein zur Folge haben kann. So könnte z. B. die Fusion von „single chain“ Antikörper oder Translokationsdomäne als heterologe Proteindomänen direkt an den C-Terminus der Proteinsequenz von Granzym B dazu führen, daß die korrekte Faltung einer der beiden oder beider Proteindomänen durch gegenseitige Beeinflussung behindert wird. Konzentrierter Kulturüberstand von *Pichia* Expressionskulturen, die mit dem GrB-scFv(FRP5) Konstrukt transformiert waren, enthielt Granzym B-Aktivität und konnte rekombinante Caspase-3 *in vitro* spalten. Das dafür verantwortliche rekombinante Protein konnte aber nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden, da im Western blot neben dem vollständigen GrB-5 Fusionsprotein auch Degradationsprodukte mit Granzym B-spezifischem Antikörper detektiert wurden, die der molaren Masse von nicht-fusioniertem Granzym B ohne scFv(FRP5) entsprachen. Die gewonnenen Daten deuten daher zwar darauf hin, daß Granzym B unter Erhalt der enzymatischen Aktivität mit scFv(FRP5) am C-Terminus der Protease fusioniert werden kann; allerdings konnte das rekombinante Protein - möglicherweise aufgrund eines Faltungsproblems - in *Pichia* nur mit sehr geringer Expressionsrate hergestellt werden. Dagegen konnte ein modifiziertes GrB-scFv(FRP5)-Konstrukt, in dem beide Proteindomänen über einen ausgedehnten Glycin-Serin-Linker verbunden sind, inzwischen in *Pichia* exprimiert und aus Kulturüberständen gereinigt werden (vgl. 4.3; B. Dälken, unveröffentlicht). Die Produktion des GrB-scFv(FRP5) Fusionsproteins erfordert daher offenbar eine Linker-Sequenz, die die Faltung beider Proteindomänen unabhängig voneinander erlaubt.

Ein weiteres Problem bei der Herstellung von multifunktionellen Fusionsproteinen kann in der Wahl des geeigneten Expressionssystems bestehen, da für die rekombinante Herstellung der einzelnen funktionellen Domänen unterschiedliche Expressionssysteme erforderlich sein können. Da z. B. in *E. coli* kein enzymatisch aktives Granzym B hergestellt werden konnte (diese Arbeit und [Kummer, 1996; Smyth, 1995; Kummer, 1993]), wurden die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Granzym B-Antikörper Fusionsproteine in der Hefe *Pichia pastoris* heterolog exprimiert. Allerdings konnten diese Fusionsproteine im Gegensatz zu nicht-modifiziertem Granzym B nur in sehr geringer Proteinausbeute gewonnen werden, und es wurde Degradierung der Fusionsproteine beobachtet (3.3.3 Abb. 3.23 C und nicht gezeigt). Im Fall von GrB-DT-5, das neben Granzym B die Translokationsdomäne von Diphtherietoxin sowie den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) enthält, könnte eine Erklärung für den proteolytischen Abbau des rekombinanten Proteins darin bestehen, daß die Translokationsdomäne eine Spaltstelle für die an Proteinreifungs-Prozessen beteiligte Protease Furin besitzt. Die Spaltung der Translokationsdomäne durch Furin ist für die Übertragung der zytotoxischen Domäne von Diphtherietoxin aus dem Endosom ins Zytoplasma der Zielzelle notwendig; in der Hefe *Pichia pastoris* findet jedoch während der Sekretion des rekombinanten Proteins ebenfalls Prozessierung durch die Furin-Protease KEX2 statt, so daß kein vollständiges Fusionsprotein im Überstand von *Pichia* Expressionskulturen nachgewiesen werden konnte. Generell wird die Verwendung eukaryotischer Expressionssysteme zur

Herstellung zytotoxischer Proteine dadurch beschränkt, daß das rekombinante Protein ebenfalls toxisch für den produzierenden Organismus ist. Andererseits könnte ein Grund dafür, daß in *E. coli* exprimiertes Granzym B nicht funktional war, darin liegen, daß für die biologische Funktion und korrekte Faltung die Glykosylierung des Proteins erforderlich sein könnte, da Granzym B in seiner physiologischen Form als stark glykosyliertes Protein sekretiert wird [Caputo, 1993]. Funktionelles Granzym B könnte in diesem Fall heterolog nur in eukaryoten Organismen exprimiert werden. Inzwischen ist jedoch enzymatisch aktives rekombinantes Granzym B kommerziell erhältlich, das in *E. coli* hergestellt wurde (vgl. 4.1; D. Jenne, pers. Mitteilung). Inwiefern dieses Protein, das bisher nicht in der Literatur beschrieben wurde, vollständig funktional im Vergleich zu nativem wildtyp Granzym B ist, bedarf jedoch der Klärung.

Für die im Folgenden beschriebenen Fusionskonstrukte, die eine der Untereinheiten von Caspase-3 enthalten, gelten die bisher dargestellten Überlegungen entsprechend. Im Fall von Caspase-3 wurde die heterologe Expression des aktiven Enzyms in *E. coli* beschrieben [Rotonda, 1996; Roy, 2001], so daß ein geeignetes Expressionssystem nicht erst gefunden werden mußte. Die Besonderheit von aktiver Caspase-3, die die Verwendung in therapeutisch einsetzbaren Fusionsproteinen limitiert oder zumindest die praktische Umsetzung erschwert, liegt jedoch darin, daß das aktive Enzym aus zwei Peptiden p12 und p17 besteht, die nicht-kovalent verbunden sind und ein Tetramer  $(p12\ p17)_2$  bilden (3.4.2 Abb. 3.32). Diese relativ komplexe Struktur läßt vermuten, daß die Fusion heterologer Proteindomänen an eine der Untereinheiten evtl. die Faltung des Proteins beeinträchtigen bzw. die Ausbildung der korrekten Struktur des aktiven Enzyms verhindern könnte. Die in dieser Arbeit aus verschiedenen Fusionsansätzen gewonnenen Ergebnisse bestätigen diese Vermutung, geben aber auch Hinweise darauf, wie Fusionen von aktiver Caspase-3 mit heterologen Proteindomänen unter Erhalt der Enzymaktivität möglich sein könnten (vgl. 4.5). Ob darüber hinaus das Einschleusen der nicht-kovalent verbundenen vier Peptide von aktiver Caspase-3 in Zellen möglich ist, ohne die Enzymstruktur durch Dissoziation der Untereinheiten voneinander zu zerstören, wäre in weiteren Experimenten zu klären.

Neben dem Erhalt der Funktionalität der als Effektoren verwendeten pro-apoptotischen Moleküle ist als weiteres Problem zu berücksichtigen, ob bzw. wie die rekombinanten Proteine in Zellen aufgenommen werden können. Der normale zelluläre Transportweg nach Rezeptor-vermittelter Endozytose verläuft vom Endosom zum Lysosom, wo gebundene Liganden von internalisierten Rezeptor-Komplexen durch Absenkung des pH Werts abgelöst und proteolytisch abgebaut werden, während die Rezeptoren recycelt und wieder an die Zelloberfläche transportiert werden. Dies ist physiologisch sinnvoll, da die Stimulierung eines Rezeptors durch seinen Ligand intrazellulär ein Signal auslöst, das durch Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes beendet wird. Für die Aufnahme von Nährstoffen oder anderen für die Zelle notwendigen Molekülen stehen spezifische Transportsysteme zur Verfügung, sofern es sich nicht um kleine Moleküle handelt, die unspezifisch durch Zellmembranen diffundieren können. Das Einschleusen komplexer Proteine als therapeutisch aktive Substanzen in Zellen stellt jedoch eine grundsätzliche Schwierigkeit und Limitierung des Einsatzes von (Fusions-) Proteinen als Therapeutika dar. Die in dieser Arbeit konstruierten Granzym B- sowie Caspase-3-Fusionsproteine enthalten daher meist eine bakterielle Translokationsdomäne von Exotoxin A oder Diphtherietoxin, die im zugrundeliegenden Toxin den Übergang der enzymatischen Domäne aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zielzellen vermittelt. Die potentielle Immunogenität solcher Proteindomänen im menschlichen Organismus ist jedoch für die therapeutische Anwendung entsprechender Fusionsproteine zu berücksichtigen bzw. experimentell zu untersuchen. Die in unserer Arbeitsgruppe gemachte

Beobachtung, daß ein Granzym B-scFv(FRP5) Fusionsprotein nur bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit Chloroquin zur Induktion von Apoptose in Zielzellen führt, bestätigt jedoch die Notwendigkeit einer Aktivität, die dem Apoptose-induzierenden Effektor-Molekül den Übergang vom Endosom ins Zytoplasma erlaubt.

#### 4.5 Caspase-3 als pro-apoptotische Effektorfunktion in Tumorzell-spezifischen Antikörper-Fusionsproteinen

##### *Theoretische Überlegungen zur Eignung von Caspase-3 für den Einsatz in anti-Tumor Strategien*

Caspase-3 ist das Molekül, in dessen Aktivierung die meisten Apoptose-Signalwege zusammenlaufen. Zellen, die keine Caspase-3 exprimieren, zeigen infolge von Apoptose-Signalen nicht die für Apoptose typische Blasenbildung auf der Zellmembran sowie keine Fragmentierung der zellulären DNA [Janicke, 1998]. Die Depletierung von endogener Caspase-3 verhindert die meisten Veränderungen im Proteom nach der Aktivierung von Caspasen, d. h. Caspase-3 ist für die meisten Veränderungen im Proteom während Apoptose verantwortlich [Martin, 2003]. Andere Veröffentlichungen stellen die Notwendigkeit von Caspase-3-Aktivität für das Eintreten von apoptotischem Zelltod in Frage und beschreiben Apoptose, die auch in Abwesenheit von Caspase-3 stattfindet. So kompensieren in Hepatozyten andere Caspasen die fehlende Aktivität von Caspase-3 nach Stimulierung von Fas; in Caspase-3 oder Caspase-9 defizienten Thymozyten konnte dagegen keine Kompensation durch andere Caspasen beobachtet werden [Zheng, 2000]. Leukozyten von Caspase-3 knockout Mäusen sind ebenfalls in der Lage, wie wildtyp Zellen apoptotischen Zelltod infolge des Entzugs von Wachstumsfaktoren zu sterben [Finkel, 2001], wobei eine bisher nicht identifizierte Initiator-Caspase als ausschlaggebender Faktor für die Signalleitung postuliert wurde [Marsden, 2002]. Während die Existenz oder physiologische Relevanz von apoptotischem Zelltod bei Blockierung der Aktivität aller zellulärer Caspasen umstritten ist, werden inzwischen auch Formen von programmiertem Zelltod beschrieben, die unabhängig von Caspasen verlaufen, an denen andere Effektormechanismen und Signalwege beteiligt sind und die sich auch morphologisch von Apoptose unterscheiden (Übersicht: [Leist, 2001]). Alle bisher verfügbaren Daten stimmen jedoch darin überein, daß die Aktivierung von Caspase-3 ein eindeutiges Apoptose-Signal darstellt und zur Auslösung von apoptotischem Zelltod führt.

Tumorzellen entgehen der Induktion von Apoptose u. a. durch die Expression von „decoy“ Rezeptoren, die Rezeptor-vermittelte Apoptose-Signale blockieren, durch den Verlust oder die veränderte Expression von Adaptormolekülen (wie FADD oder Apaf-1), durch Überexpression von „decoy“ Enzymen (Flip) oder durch Überexpression von „inhibitor of apoptosis proteins“ (IAPs) [Igney, 2002; Johnstone, 2002]. Diese Veränderungen verhindern die Aktivierung endogener Caspasen und damit die Induktion von Apoptose infolge pro-apoptotischer Signale. Die intrazelluläre Applikation exogener, aktiver Caspase-3 in Tumorzellen stellt daher einen sehr vielversprechenden Weg dar, in diesen Zellen trotzdem apoptotischen Zelltod zu initiieren, zumal aktive Caspase-3 gleichermaßen als Signal und zentraler Effektor wirkt.

Als Enzym bietet Caspase-3 wie Granzym B den Vorteil, daß wahrscheinlich relativ geringe intrazelluläre Konzentrationen ausreichen, um einen zytotoxischen Effekt hervorzurufen. Mithilfe des Transduktionsreagens BioPORTER wurde eine aktive Form von Caspase-3 in Tumorzellen appliziert und führte bei Behandlung von  $10^5$  Zellen mit 3.3 ng Caspase-3 im Komplex mit BioPORTER zur effizienten Induktion von Apoptose in 59% der behandelten

Zellen [Zelphati, 2001]. Dagegen waren 450 ng Granzym B erforderlich, um nach entsprechender Behandlung von Zellen mit Granzym B / BioPORTER-Komplexen Apoptose in 60% der Zellen zu erzielen. Die in der vorliegenden Arbeit hergestellte rekombinante aktive Caspase-3, die aus den beiden Untereinheiten p12 und p17 *in vitro* rekonstituiert wurde (3.4.1), konnte ebenfalls in 50-fach geringerer Konzentration im Vergleich zu Granzym B nach Einschleusen in HeLa Zellen mit BioPORTER DNA-Fragmentierung und Apoptose induzieren (nicht gezeigt).

Die Verwendung von rekombinanter, enzymatisch aktiver Caspase-3 als Effektorfunktion in therapeutischen Tumorzell-spezifischen Fusionsproteinen stellt daher eine wahrscheinlich im Vergleich zu Granzym B noch effizientere Möglichkeit dar, Tumorzellen durch direkte Induktion von Apoptose zu eliminieren. Inwiefern die Überexpression von IAPs durch Tumorzellen diesen Ansatz beschränkt, müßte experimentell untersucht werden und hängt wahrscheinlich von den relativen intrazellulären Proteinkonzentrationen an IAPs und exogener Caspase-3 ab. Möglicherweise kann jedoch die Aktivierung endogener Caspasen durch exogene aktive Caspase-3 eine vielfache Amplifizierung des therapeutischen Signals bewirken.

### ***Konstruktion, Expression und Charakterisierung von Caspase-3-Antikörper Fusionsproteinen***

Die praktische Umsetzung des theoretisch sehr vielversprechenden Konzepts, durch intrazelluläre Applikation von aktiver Caspase-3 in Tumorzellen selektiv Apoptose in diesen Zellen zu induzieren, ist aus den unter 4.4 diskutierten Gründen problematisch. Enzymatisch aktive Caspase-3 konnte als rekombinantes Protein durch separate Expression der beiden Untereinheiten p12 und p17 in *E. coli*, denaturierende Reinigung und Rekonstituierung des Enzyms durch gemeinsame Renaturierung von p12 und p17 hergestellt werden (3.4.1). Zur selektiven Aufnahme des rekombinanten Proteins in Tumorzellen wurden Möglichkeiten untersucht, eine der beiden Untereinheiten mit dem ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper FRP5 zu fusionieren, ohne dadurch die Struktur der aktiven Caspase-3 und Enzymaktivität zu zerstören. Um die Freisetzung der aktiven, exogenen Caspase-3 nach Rezeptor-vermittelter Endozytose aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zellen zu gewährleisten, wurden außerdem die Translokationsdomänen der bakteriellen Toxine Exotoxin A und Diphtherietoxin eingesetzt (vgl. 3.4.2).

Zunächst wurden Fusionen an den N-Terminus der p12 Untereinheit sowie an den C-Terminus der p17 Untereinheit konstruiert, da diese beiden Peptidenden aus der Struktur des aktiven Enzyms herausragen (3.4.2 Abb. 3.32), so daß an diesen Positionen möglicherweise heterologe Proteindomänen ohne Verlust der Enzymaktivität toleriert werden. Nach Expression beider Konstrukte in *E. coli* und Rückfaltung der gereinigten, denaturierten Proteine zusammen mit der jeweils komplementären Caspase-3 Untereinheit konnte jedoch für keines der rekombinanten Proteine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür konnte nach dreidimensionaler Betrachtung der Kristallstruktur von Caspase-3 gefunden werden, die zeigt, daß der N-Terminus der p12 Untereinheit und der C-Terminus der p17 Untereinheit sehr dicht beieinander liegen und möglicherweise interagieren. Zwischen dem C-Terminus von p17 und dem N-Terminus von p12 erfolgt in Procaspase-3 die Spaltung, die zur Aktivierung des Enzyms führt. Während ursprünglich angenommen wurde, daß das Proenzym inaktiv und Spaltung für die enzymatische Aktivität notwendig ist, konnte inzwischen gezeigt werden, daß auch Procaspase-3 intrinsische Aktivität besitzt, die jedoch pH-abhängig durch ein Aspartat-Tripeptid reguliert wird, das in unmittelbarer Nähe der Spaltstelle liegt. *In vitro* findet bei pH 5.5 Aktivierung von Procaspase-3 statt, die zur autokatalytischen Proteolyse zwischen den Untereinheiten führt [Roy, 2001]. Die pH-Änderung



induziert offenbar eine Konformationsänderung im Proenzym, die durch den aus dem Molekül herausragenden loop mit Aspartat-Tripeptid und Spaltstelle vermittelt wird und eine funktionelle Konformation der katalytischen Zentren des Enzyms induziert. Heterologe Proteindomänen am N-Terminus von p12 oder am C-Terminus von p17 verhindern damit möglicherweise die Ausbildung der aktiven Konformation von Caspase-3.

Daher wurden weitere Fusionsproteine konstruiert, die „single chain“ Antikörper und Translokationsdomäne am N-Terminus von p17 oder am C-Terminus von p12 enthalten (3.4.2). Während die Expression von 5-ETAIL-p17 in *E. coli* nur zu einem niedermolekularen Abbau-produkt führte (Abb. 3.33 B), konnte für p12-DT-5 nach Renaturierung mit der p17 Untereinheit keine enzymatische Aktivität des rekombinanten Fusionsproteins *in vitro* nachgewiesen werden (Abb. 3.34). Dagegen werden heterologe Proteindomänen am N-Terminus von p17 offenbar unter Erhalt der Caspase-3-Aktivität toleriert. Ein rekombinantes Fusionsprotein, das eine verkürzte Version der Translokationsdomäne von Exotoxin A am N-Terminus von p17 enthält, konnte nach Rekonstituierung mit p12 ein colorimetrisches, Caspase-3-spezifisches Peptidsubstrat spalten. Die zusätzliche Fusion des „single chain“ Antikörpers FRP5 an den C-Terminus von p17 führte allerdings wieder zum Verlust der enzymatischen Aktivität des rekonstituierten Proteins (Abb. 3.36). Andere Daten aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen die Möglichkeit, an den N-Terminus der p17 Untereinheit zusätzliche Peptidsequenzen zu fusionieren: Eine Biotinylierungssequenz konnte anstelle der Prodomäne an den N-Terminus der p17 Untereinheit im Proenzym angefügt werden, ohne daß die autokatalytische Prozessierung von Caspase-3 durch Absinken des pH Werts im Medium der *E. coli* Expressionskultur inhibiert wurde (B. Dälken, unveröffentlicht).

Das rekombinante Fusionsprotein ETAIL-p17 + p12, das enzymatische Caspase-3 Aktivität besitzt, zeigt jedoch keinen zytotoxischen Effekt gegenüber Kulturen etablierter Tumorzelllinien, da es über keine Zellbindungsdomäne verfügt und daher nicht in Zellen aufgenommen werden kann. Tumorzell-spezifische Zellbindungsaktivität könnte in weitergehenden Fusionsansätzen möglicherweise durch Kombination von ETAIL-p17 mit einem p12-scFv(FRP5) Fusionsprotein in das rekombinante Enzym integriert werden. Die Expression des trifunktionalen 5-ETAIL-p17 in *E. coli* war wie bereits erwähnt nicht möglich. Inwiefern das Einfügen von Linker-Sequenzen zwischen die funktionellen Domänen die Expression dieses Fusionsproteins positiv beeinflusst oder allgemein die Herstellung von enzymatisch aktiven Caspase-3-Fusionen aus den beschriebenen Konstrukten erlaubt, müßte in weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Ebenfalls müßte in weiteren Arbeiten geklärt werden, ob Fusionsproteine, die z. B. als scFv(FRP5)-p17 + p12 nur einen „single chain“ Antikörper zur selektiven Bindung an ErbB2-positive Tumorzellen, aber keine Translokationsdomäne enthalten, funktional sind und Apoptose in Zielzellen induzieren können. Vorläufige neue Daten aus unserer Arbeitsgruppe deuten darauf hin, daß ein solches rekombinantes Protein, das den „single chain“ Antikörper FRP5 sowie die p17 und p12 Untereinheiten von Caspase-3 in einem Polypeptid enthält und zwischen scFv(FRP5) und p17 sowie p17 und p12 anstelle der endogenen Caspase-3 Spaltstelle eine Erkennungssequenz der Protease Furin besitzt, die zur Spaltung und Aktivierung des rekombinanten Proteins während der Internalisierung in Endosomen führt, wie im Fall der GrB-scFv(FRP5) Fusionskonstrukte nur zusammen mit Chloroquin zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt (B. Dälken, pers. Mitteilung).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten damit keine Caspase-3-Fusionsproteine hergestellt werden, die als potentiell therapeutische Moleküle selektiv in Tumorzellen aufgenommen werden und zur Induktion von Apoptose führen. Es konnte aber gezeigt werden, daß die Fusion heterologer Proteindomänen, die Zellbindungs- oder „endosome escape“ Funktion besitzen,

an den N-Terminus der p17 Untereinheit unter Erhalt der Enzymaktivität nach Rekonstitution von Caspase-3 mit der p12 Untereinheit möglich ist. Dieses Ergebnis diene als Voraussetzung für die Entwicklung weiterer Fusionskonstrukte, die gegenwärtig in der Arbeitsgruppe durchgeführt wird.

#### 4.6 Pro-apoptotische Moleküle für den therapeutischen Einsatz in anti-Tumor Strategien

Das Konzept, pro-apoptotische Moleküle durch Fusion mit Tumorzell-spezifischen Zellbindungsdomänen auszustatten und diese Effektorproteine so zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen therapeutisch zu nutzen, ist so theoretisch naheliegend und vielversprechend wie in der praktischen Umsetzung komplex (vgl. 4.4). Tatsächlich wurden in der Literatur bisher nur zwei direkt vergleichbare Ansätze beschrieben, die die pro-apoptotischen Bcl-2 Proteine Bik, Bak und Bax oder die DNase CAD (s. u.) als Fusionen mit dem Peptidhormon „gonadotropin releasing hormone“ (GnRH) verwenden [Azar, 2000]. Der Rezeptor für GnRH wird auf verschiedenen Adenokarzinomen exprimiert, und verschiedene Adenokarzinom-Zelllinien sind *in vitro* sensitiv gegenüber Bik-, Bak- sowie Bax-GnRH. Nach Behandlung von Zellen mit den rekombinanten Proteinen konnte die Induktion von apoptotischem Zelltod beobachtet werden, obwohl die Proteine über keine Aktivität verfügen, die das rekombinante Protein nach Rezeptor-vermittelter Endozytose aus dem Endosom ins Zytoplasma freisetzt und den Abbau im lysosomalen Kompartiment verhindert. Die in diesem Ansatz verwendeten Bcl-2 Proteine besitzen jedoch Lokalisierungssignale, die die Verankerung der endogenen Proteine in der Membran der Mitochondrien veranlassen. Möglicherweise sind diese Signalsequenzen auch dafür verantwortlich, daß die rekombinanten Fusionsproteine aus dem Endosom an den normalen physiologischen Aufenthaltsort ihrer endogenen Verwandten transportiert werden [Ben-Yehudah, 2002].

Ein weiteres potentiell therapeutisch einsetzbares Fusionsprotein wurde beschrieben, das neben GnRH als Tumorzell-spezifische Zellbindungsdomäne die DNase CAD enthält [Ben-Yehudah, 2003]. CAD wird während Apoptose in Abhängigkeit von Caspase-3 aktiviert und ist für die Fragmentierung der zellulären DNA während Apoptose verantwortlich [Enari, 1998; Sakahira, 1998]. Die Experimente wurden allerdings nicht mit gereinigtem Protein durchgeführt, sondern mit der denaturierten und rückgefalteten unlöslichen Gesamt-Proteinfraction von *E. coli* Expressionskulturen. Das so partiell gereinigte GnRH-CAD Fusionsprotein besitzt Nuklease-Aktivität *in vitro*, obwohl andere Veröffentlichungen bisher die rekombinante Expression der DNase nur bei gleichzeitiger Co-Expression des als Chaperon dienenden Inhibitors ICAD beschreiben [Sakahira, 2000; Liu, 1998]. Darüber hinaus wurde ein zytotoxischer Effekt von GnRH-CAD auf verschiedene Adenokarzinom-Zelllinien beobachtet, und es konnte DNA-Fragmentierung in diesen Zellen nachgewiesen werden. Allerdings führten relativ hohe Proteinkonzentrationen bei langen Inkubationszeiten nur partiell zum Sterben der Zellen: Nach Behandlung von Zellen mit 5 µg/ml Gesamtprotein für 72 Stunden wurden noch ca. 40% lebende Zellen relativ zu unbehandelten Kontroll-Zellen detektiert. Wie das rekombinante Protein nach Rezeptor-vermittelter Internalisierung aus dem Endosom ins Zytoplasma freigesetzt wird, ist unklar; wie im Fall der Bcl-2-Fusionsproteine besitzt CAD jedoch ein Lokalisierungssignal, das den Transport des endogenen wie auch des rekombinanten GnRH-Fusionsproteins in den Zellkern vermittelt und möglicherweise auch für die Freisetzung aus dem Endosom verantwortlich ist [Ben-Yehudah, 2002]. Vorläufige *in vivo* Daten zeigen darüber hinaus einen inhibitorischen Effekt von GnRH-CAD auf das Wachstum solider Tumore in einem Mausmodell [Ben-Yehudah, 2003].

Caspase-3 wurde als Effektorfunktion in einem therapeutischen Ansatz zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen eingesetzt. Zellspezifität wurde in diesem Fall dadurch erreicht, daß eine modifizierte Form von Procaspase-3 verwendet wurde, die anstelle der Caspase-Spaltsequenz zwischen den beiden Untereinheiten eine Erkennungssequenz für die HIV-Protease besitzt, so daß das rekombinante Protein selektiv in HIV-infizierten Zellen, die HIV-Protease exprimieren, aktiviert wird und zur Induktion von Apoptose führt [Vocero-Akbani, 1999]. In nicht-infizierten Zellen kann die modifizierte Caspase-3 dagegen nicht aktiviert werden und liegt als inaktive Procaspase vor. Um das rekombinante Protein in Zielzellen einzuschleusen, wurde das Konstrukt mit dem als „protein transduction sequence“ beschriebenen, stark kationischen Signalpeptid des HIV Tat Proteins [Nagahara, 1998]) fusioniert, das die unselektive Aufnahme in Zellen erlaubt. *In vitro* sind jedoch bereits sehr hohe Proteinkonzentrationen erforderlich, um in Zellen, die HIV-Protease exprimieren, effizient Apoptose auszulösen. Da rekombinante tat-Fusionsproteine darüber hinaus alle Körperzellen transduzieren [Schwarze, 1999], würde die systemische Behandlung von Patienten wahrscheinlich Proteinmengen erfordern, die in einem realistischen Kostenrahmen nicht herstellbar sind. Während die ursprünglichen Publikationen die „protein transduction sequence“ des Tat Proteins als außerordentlich effizient beschreiben, die das Einschleusen beliebiger Proteine in nahezu 100% der untersuchten Zellen ermöglicht [Vocero-Akbani, 1999], zeigt eine neue Arbeit zur Funktionsweise des tat-Peptids jedoch, daß die basischen Aminosäuren im Wesentlichen die unspezifische Bindung des Proteins an Zellen vermitteln, nicht jedoch die aktive Aufnahme bzw. den Membrandurchtritt der Fusionspartner fördern [Leifert, 2002]. Für die therapeutische Applikation von Proteinen in Zellen erscheint dieser Mechanismus daher als zu wenig effizient und liefert eine Erklärung für die Notwendigkeit der hohen Proteinkonzentrationen. In der vorliegenden Arbeit wurde das tat-Peptid ebenfalls eingesetzt mit dem Ziel, Granzym B in Zellen einzuschleusen (3.3.1). Es konnte jedoch keine Änderung des Internalisierungsverhaltens von Granzym B beobachtet werden; GrB-tat wurde weder in das Zytoplasma behandelter Zellen aufgenommen noch reicherte sich das rekombinante Protein im Zellkern der Zellen an (Abb. 3.19).

Bei der Entwicklung pro-apoptotischer Moleküle für therapeutische Anwendungen muß berücksichtigt werden, daß das Forschungsgebiet, das sich mit der Aufklärung der Apoptose-Signalwege, der beteiligten Proteine und Regulationsmechanismen beschäftigt, ein sehr junges ist. Das derzeitige Wissen wurde praktisch innerhalb der letzten fünfzehn Jahre gewonnen, und inzwischen ist ein annähernd zusammenhängendes Bild der molekularen Mechanismen von Apoptose vorhanden. Zu Beginn dieser Arbeit war der Stand der Grundlagenforschung aber insbesondere über die Funktionsweise von Granzym B nur wenig fortgeschritten, so daß in dieser Arbeit zunächst relativ umfangreiche eigene Arbeiten zur Charakterisierung von Granzym B durchgeführt wurden (vgl. 4.2). Insbesondere wurde das Verhalten des rekombinanten Proteins, das in der Hefe *Pichia pastoris* hergestellt werden konnte, gegenüber Kulturen etablierter Tumorzelllinien in Abwesenheit von Perforin oder einem funktionellen Äquivalent untersucht. Dabei wurde ein neuer extrazellulärer Effekt von Granzym B auf Kulturen adhärenter Zellen beobachtet, der bei relativ hohen Proteinkonzentrationen eintritt und nach Inkubation der Zellen über mehrere Tage ebenfalls zum Zelltod führt, der mit Anzeichen von Apoptose verbunden ist. Die Morphologie der behandelten Zellen deutet darauf hin, daß Granzym B den Aufbau der extrazellulären Matrix verhindert, indem es möglicherweise Komponenten der extrazellulären Matrix spaltet. Für therapeutische Zwecke ist dieser Effekt jedoch weder von Bedeutung noch von Interesse, da hohe Proteinkonzentrationen *in vitro* erforderlich sind und Zellen unselektiv angegriffen werden. Bei niedrigeren Granzym B-Konzentrationen, die für therapeutische Behandlungen relevant sein könnten, wurde jedoch kein zytotoxischer Effekt von rekombinantem, nicht-

modifiziertem Granzym B auf verschiedene Tumorzelllinien beobachtet, so daß wahrscheinlich nicht mit unspezifischer Toxizität bei einer systemischen Behandlung mit Tumorzell-spezifischen Granzym B-Derivaten zu rechnen ist. Die weitere Entwicklung von Granzym B als Apoptose-induzierende Effektorfunktion in Antikörper-Fusionsproteinen ist daher nach wie vor ein sehr vielversprechender Ansatz, um in Tumorzellen effizient Apoptose auszulösen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Fusion heterologer Proteindomänen an den C-Terminus der Protease ohne Verlust der enzymatischen Aktivität möglich ist, während zusätzliche Peptidsequenzen am N-Terminus von reifem Granzym B zumindest partiell zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Wenn auch keine Granzym B-Fusionsproteine im präparativen Maßstab hergestellt werden konnten, liefern diese Ergebnisse dennoch wichtige Informationen für weitere Arbeiten, um Granzym B durch Fusion mit einem „single chain“ Antikörper und evtl. einer bakteriellen Translokationsdomäne mit Tumorzell-spezifischer Zellbindungsaktivität auszustatten und der Protease außerdem nach Rezeptor-vermittelter Endozytose den Übergang vom Endosom in das Zytoplasma der Zielzellen zu erlauben. Im Fall von Caspase-3 als pro-apoptotische Effektorfunktion konnte gezeigt werden, daß heterologe Proteindomänen am N-Terminus der p17 Untereinheit unter Erhalt der Enzymaktivität toleriert werden, während Fusionen an den N- und C-Terminus der p12 Untereinheit wie auch an den C-Terminus von p17 zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen. Diese Ergebnisse dienen als Grundlage für die weitere Entwicklung von Caspase-3- sowie Granzym B-scFv(FRP5) Fusionsproteinen, die auf der Modifizierung der in dieser Arbeit verfolgten Ansätze basiert und gegenwärtig in der Arbeitsgruppe durchgeführt wird.

## 5 Abkürzungen und Einheiten

|                   |   |
|-------------------|---|
| A                 | Ampère  |
| Abb.              | Abbildung (Stromstärke)                                     |
| Ac-DEVD-pNA       | N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroanilid                      |
| Ac-IETD-CHO       | N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-Aldehyd                            |
| Ac-IETD-pNA       | N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-Nitroanilid                      |
| AP                | Alkalische Phosphatase                                      |
| APS               | Ammoniumperoxodisulfat                                      |
| AS                | Aminosäure  |
| bp                | Basenpaare  |
| BSA               | Rinder-Serumalbumin (engl. bovine serum albumine)           |
| bzw.              | beziehungsweise   |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i>                               |
| ca.               | circa   |
| cDNA              | komplementäre DNA (engl. complementary DNA)                 |
| CLSM              | Konfokale Laser Scanning Mikroskopie                        |
| ctrl.             | Kontrolle (engl. control)                                   |
| d. h.             | das heißt   |
| DMEM              | Dulbecco's modified Eagle's Medium                          |
| DMF               | Dimethylformamid  |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid  |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                                      |
| DT                | Diphtherietoxin   |
| DTT               | Dithiothreitol  |
| <i>E. coli</i>    | <i>Escherichia coli</i>                                     |
| ECL               | „enhanced chemoluminescence“                                |
| EDTA              | Ethylendiamin-tetraacetat                                   |
| EGF               | epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor) |
| ELISA             | „enzyme-linked immunosorbent assay“                         |
| entspr.           | entsprechend  |
| ER                | Endoplasmatisches Retikulum                                 |
| ETA               | Exotoxin A  |
| evtl.             | eventuell   |
| F                 | Farad (Kapazität)   |
| FACS              | „fluorescence activated cell sorting“                       |
| FITC              | Fluorescein-Isothiocyanat                                   |
| g                 | Erdbeschleunigung   |
|                   | Gramm   |
| GST               | Gluthation-S-Transferase                                    |
| GrB               | Granzym B   |
| GrB-5             | Granzym B-scFv(FRP5)  |
| h                 | Stunden   |
| HBS               | „Hepes buffered saline“                                     |
| HIV               | humanes Immunodefizienz-Virus                               |
| HRP               | Meerrettich Peroxidase (engl. horse radish peroxidase)      |
| IgG               | Immunoglobulin G  |
| IPTG              | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid                  |
| k                 | Kilo ( $10^3$ )   |

|                      |   |
|----------------------|---|
| kb                   | Kilobasenpaare  |
| kDa                  | Kilodalton  |
| l                    | Liter   |
| m                    | Meter   |
|                      | milli ( $10^{-3}$ )   |
| M                    | molar (mol/Liter)   |
| MHC                  | „major histocompatibility complex“                          |
| min.                 | Minuten   |
| mRNA                 | messenger RNA   |
| $\mu$                | micro ( $10^{-6}$ )   |
| n                    | nano ( $10^{-9}$ )  |
| neg. ctrl.           | Negativkontrolle  |
| OD <sub>x</sub>      | optische Dichte bei der Wellenlänge x nm                    |
| p                    | piko ( $10^{-12}$ )   |
| <i>P. pastoris</i>   | <i>Pichia pastoris</i>                                      |
| PBS                  | „phosphate buffered saline“                                 |
| PAGE                 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                             |
| PCR                  | Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction) |
| PI                   | Propidiumjodid  |
| pos. ctrl.           | Positivkontrolle  |
| RNA                  | Ribonukleinsäure  |
| RT-PCR               | Reverse Transkriptase-PCR                                   |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                             |
| s. o.                | siehe oben  |
| s. u.                | siehe unten   |
| SA                   | Streptavidin  |
| scFv                 | „single chain“ Antikörper                                   |
| SDS                  | Natrium-Dodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulphate)       |
| Sek.                 | Sekunden  |
| sog.                 | sogenannte/r/s  |
| Std.                 | Stunden   |
| TBS                  | „Tris buffered saline“                                      |
| TEMED                | N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin                             |
| Tris                 | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                             |
| U                    | Unit (Enzymaktivität)                                       |
| u. a.                | unter anderem   |
| UpM                  | Umdrehungen pro Minute                                      |
| V                    | Volt (Spannung)   |
| v. a.                | vor allem   |
| vgl.                 | vergleiche  |
| v/v                  | „volume per volume“   |
| W                    | Watt (Leistung)   |
| WB                   | Western blot  |
| w/v                  | „weight per volume“   |
| z. B.                | zum Beispiel  |
| z. T.                | zum Teil  |
| zVAD-fmk             | Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluormethylketon              |

## 6 Literatur

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-32.

Alimonti, J. B., Shi, L., Baijal, P. K., and Greenberg, A. H. (2001). Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 276, 6974-82.

Andrade, F., Bull, H. G., Thornberry, N. A., Ketner, G. W., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. (2001). Adenovirus L4-100K assembly protein is a granzyme B substrate that potently inhibits granzyme B-mediated cell death. *Immunity* 14, 751-61.

Andrade, F., Roy, S., Nicholson, D., Thornberry, N., Rosen, A., and Casciola-Rosen, L. (1998). Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 8, 451-60.

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-30.

Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W., and Bleackley, R. C. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 273, 21261-6.

Atkinson, E. A., and Bleackley, R. C. (1995). Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit Rev Immunol* 15, 359-84.

Azar, Y., and Lorberboum-Galski, H. (2000). GnRH-Bik/Bax/Bak chimeric proteins target and kill adenocarcinoma cells; the general use of pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family as novel killing components of targeting chimeric proteins. *Apoptosis* 5, 531-42.

Azemar, M., Schmidt, M., Arlt, F., Kennel, P., Brandt, B., Papadimitriou, A., Groner, B., and Wels, W. (2000). Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int J Cancer* 86, 269-75.

Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D. L., and Benhar, I. (2001). Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312, 79-93.

Barry, M., and Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-9.

Barry, M., Heibei, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R., and Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781-94.

Ben-Yehudah, A., Aqeilan, R., Belostotsky, R., Azar, Y., and Lorberboum-Galski, H. (2002). Utilizing chimeric proteins for exploring the cellular fate of endogenous proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 332-8.

Ben-Yehudah, A., Aqeilan, R., Robashkevich, D., and Lorberboum-Galski, H. (2003). Using Apoptosis for Targeted Cancer Therapy by a New Gonadotropin Releasing Hormone-DNA Fragmentation Factor 40 Chimeric Protein. *Clin Cancer Res* 9, 1179-90.

Bissonnette, R. P., Echeverri, F., Mahboubi, A., and Green, D. R. (1992). Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 359, 552-4.

Bladergroen, B. A., Strik, M. C., Bovenschen, N., van Berkum, O., Scheffer, G. L., Meijer, C. J., Hack, C. E., and Kummer, J. A. (2001). The granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, is mainly expressed by dendritic cells and at immune-privileged sites. *J Immunol* 166, 3218-25.

Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-41.

Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-15.

Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6, 497-507.

Bouillet, P., and Strasser, A. (2002). BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-74.

Bratton, S. B., Lewis, J., Butterworth, M., Duckett, C. S., and Cohen, G. M. (2002). XIAP inhibition of caspase-3 preserves its association with the Apaf-1 apoptosome and prevents CD95- and Bax-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 9, 881-92.

Bratton, S. B., Walker, G., Srinivasula, S. M., Sun, X. M., Butterworth, M., Alnemri, E. S., and Cohen, G. M. (2001). Recruitment, activation and retention of caspases-9 and -3 by Apaf-1 apoptosome and associated XIAP complexes. *Embo J* 20, 998-1009.

Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., and Savill, J. (2002). Apoptosis disables CD31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature* 418, 200-3.

Browne, K. A., Blink, E., Sutton, V. R., Froelich, C. J., Jans, D. A., and Trapani, J. A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol* 19, 8604-15.

Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A., and Trapani, J. A. (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* 275, 39262-6.

Buchner, J., and Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9, 157-62.

Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., and et al. (1995). Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 269, 1885-8.

Bursch, W. (2001). The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 8, 569-81.

Buzza, M. S., Hirst, C. E., Bird, C. H., Hosking, P., McKendrick, J., and Bird, P. I. (2001). The granzyme B inhibitor, PI-9, is present in endothelial and mesothelial cells, suggesting that it protects bystander cells during immune responses. *Cell Immunol* 210, 21-9.

Cain, K., Bratton, S. B., and Cohen, G. M. (2002). The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84, 203-14.

Cain, K., Brown, D. G., Langlais, C., and Cohen, G. M. (1999). Caspase activation involves the formation of the aposome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem* 274, 22686-92.

Caputo, A., Garner, R. S., Winkler, U., Hudig, D., and Bleackley, R. C. (1993). Activation of recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *J Biol Chem* 268, 17672-5.

Caputo, A., James, M. N., Powers, J. C., Hudig, D., and Bleackley, R. C. (1994). Conversion of the substrate specificity of mouse proteinase granzyme B. *Nat Struct Biol* 1, 364-7.

Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66.



- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-4.
- Cheng, E. H., Wei, M. C., Weiler, S., Flavell, R. A., Mak, T. W., Lindsten, T., and Korsmeyer, S. J. (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 8, 705-11.
- Chimini, G. (2002). Apoptosis: repulsive encounters. *Nature* 418, 139-41.
- Chinnaiyan, A. M., Hanna, W. L., Orth, K., Duan, H., Poirier, G. G., Froelich, C. J., and Dixit, V. M. (1996). Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr Biol* 6, 897-9.
- Conradt, B., and Horvitz, H. R. (1998). The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-29.
- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-56.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16, 23-52.
- Cretny, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-61.
- Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1996). Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 271, 21709-12.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-8.
- Davis, J. E., Sutton, V. R., Smyth, M. J., and Trapani, J. A. (2000). Dependence of granzyme B-mediated cell death on a pathway regulated by Bcl-2 or its viral homolog, BHRF1. *Cell Death Differ* 7, 973-83.
- Deveraux, Q. L., and Reed, J. C. (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13, 239-52.
- Donepudi, M., Sweeney, A. M., Briand, C., and Grutter, M. G. (2003). Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Mol Cell* 11, 543-549.
- Doyle, A., Martin, W. J., Funa, K., Gazdar, A., Carney, D., Martin, S. E., Linnoila, I., Cuttitta, F., Mulshine, J., Bunn, P., and et al. (1985). Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer. *J Exp Med* 161, 1135-51.
- Drazin, R., Kandel, J., and Collier, R. J. (1971). Structure and activity of diphtheria toxin. II. Attack by trypsin at a specific site within the intact toxin molecule. *J Biol Chem* 246, 1504-10.
- Driscoll, M. (1992). Molecular genetics of cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurobiol* 23, 1327-51.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Poirier, G. G., Froelich, C. J., He, W. W., and Dixit, V. M. (1996). ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem* 271, 16720-4.
- Dubel, S., Breitling, F., Kontermann, R., Schmidt, T., Skerra, A., and Little, M. (1995). Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J Immunol Methods* 178, 201-9.

- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- Efthymiadis, A., Briggs, L. J., and Jans, D. A. (1998). The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties. *J Biol Chem* 273, 1623-8.
- Ekert, P. G., Silke, J., and Vaux, D. L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6, 1081-6.
- Elsasser, A., Suzuki, K., Lorenz-Meyer, S., Bode, C., and Schaper, J. (2001). The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol* 96, 219-26.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Estebanez-Perpina, E., Fuentes-Prior, P., Belorgey, D., Braun, M., Kieffersauer, R., Maskos, K., Huber, R., Rubin, H., and Bode, W. (2000). Crystal structure of the caspase activator human granzyme B, a proteinase highly specific for an Asp-P1 residue. *Biol Chem* 381, 1203-14.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-6.
- Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-8.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-28.
- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7464-9.
- Finkel, E. (2001). The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science* 292, 624-6.
- Frankel, A. E., Kreitman, R. J., and Sausville, E. A. (2000). Targeted toxins. *Clin Cancer Res* 6, 326-34.
- French, L. E., and Tschopp, J. (2002). Defective death receptor signaling as a cause of tumor immune escape. *Semin Cancer Biol* 12, 51-5.
- Froelich, C. J., Hanna, W. L., Poirier, G. G., Duriez, P. J., D'Amours, D., Salvesen, G. S., Alnemri, E. S., Earnshaw, W. C., and Shah, G. M. (1996a). Granzyme B/perforin-mediated apoptosis of Jurkat cells results in cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase to the 89-kDa apoptotic fragment and less abundant 64-kDa fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 658-65.
- Froelich, C. J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G. M., Bleackley, R. C., Dixit, V. M., and Hanna, W. (1996b). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem* 271, 29073-9.
- Froelich, C. J., Zhang, X., Turbov, J., Hudig, D., Winkler, U., and Hanna, W. L. (1993). Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol* 151, 7161-71.
- Fulda, S., Meyer, E., and Debatin, K. M. (2002). Inhibition of TRAIL-induced apoptosis by Bcl-2 overexpression. *Oncogene* 21, 2283-94.
- Galvin, J. P., Spaeny-Dekking, L. H., Wang, B., Seth, P., Hack, C. E., and Froelich, C. J. (1999). Apoptosis induced by granzyme B-glycosaminoglycan complexes: implications for granule-mediated apoptosis in vivo. *J Immunol* 162, 5345-50.
- Gerstmayer, B. (1997a). Kostimulatorische Fusionsproteine für eine gerichtete Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. Dissertation, Universität Freiburg.

- Gerstmayer, B., Altenschmidt, U., Hoffmann, M., and Wels, W. (1997b). Costimulation of T cell proliferation by a chimeric B7-2 antibody fusion protein specifically targeted to cells expressing the erbB2 proto-oncogene. *J Immunol* 158, 4584-4590.
- Gibson, R. M. (2001). Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *Bmj* 322, 1539-40.
- Gimmi, C. D., Freeman, G. J., Gribben, J. G., Gray, G., and Nadler, L. M. (1993). Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6586-90.
- Gleiss, B., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Fadeel, B. (2002). Fas-triggered phosphatidylserine exposure is modulated by intracellular ATP. *FEBS Lett* 519, 153-8.
- Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Arora, N., Henderson, M. A., and Leppla, S. H. (1995). Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun* 63, 82-7.
- Gougeon, M. L., and Montagnier, L. (1999). Programmed cell death as a mechanism of CD4 and CD8 T cell deletion in AIDS. Molecular control and effect of highly active anti-retroviral therapy. *Ann N Y Acad Sci* 887, 199-212.
- Green, D. R. (2000). Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. *Cell* 102, 1-4.
- Green, D. R., and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281, 1309-12.
- Griffiths, G. M. (1997). Protein sorting and secretion during CTL killing. *Semin Immunol* 9, 109-15.
- Griffiths, G. M., and Isaaz, S. (1993). Granzymes A and B are targeted to the lytic granules of lymphocytes by the mannose-6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 120, 885-96.
- Grotzer, M. A., Eggert, A., Zuzak, T. J., Janss, A. J., Marwaha, S., Wiewrodt, B. R., Ikegaki, N., Brodeur, G. M., and Phillips, P. C. (2000). Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Oncogene* 19, 4604-10.
- Gutter, M. G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10, 649-55.
- Gu, Y., Sarnecki, C., Fleming, M. A., Lippke, J. A., Bleackley, R. C., and Su, M. S. (1996). Processing and activation of CMH-1 by granzyme B. *J Biol Chem* 271, 10816-20.
- Guan, K. L., and Dixon, J. E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem* 192, 262-7.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94, 339-52.
- Hall, P. D., Virella, G., Willoughby, T., Atchley, D. H., Kreitman, R. J., and Frankel, A. E. (2001). Antibody response to DT-GM, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin (DT) linked to human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM), during a phase I trial of patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Immunol* 100, 191-7.
- Han, Z., Hendrickson, E. A., Bremner, T. A., and Wyche, J. H. (1997). A sequential two-step mechanism for the production of the mature p17:p12 form of caspase-3 in vitro. *J Biol Chem* 272, 13432-6.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-80.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

- Harris, J. L., Peterson, E. P., Hudig, D., Thornberry, N. A., and Craik, C. S. (1998). Definition and redesign of the extended substrate specificity of granzyme B. *J Biol Chem* 273, 27364-73.
- Hausmann, G., O'Reilly, L. A., van Driel, R., Beaumont, J. G., Strasser, A., Adams, J. M., and Huang, D. C. (2000). Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 149, 623-34.
- Heibein, J. A., Barry, M., Motyka, B., and Bleackley, R. C. (1999). Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) and cytochrome c release are caspase independent. *J Immunol* 163, 4683-93.
- Hellman, S., and Vokes, E. E. (1996). Advancing current treatments for cancer. *Sci Am* 275, 118-23.
- Hengartner, M. O. (1997). Apoptosis. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 388, 714-5.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-6.
- Hersh, E. M., Metch, B. S., Muggia, F. M., Brown, T. D., Whitehead, R. P., Budd, G. T., Rinehart, J. J., Crawford, E. D., Bonnet, J. D., and Behrens, B. C. (1991). Phase II studies of recombinant human tumor necrosis factor alpha in patients with malignant disease: a summary of the Southwest Oncology Group experience. *J Immunother* 10, 426-31.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., and Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-87.
- Hoffmann, M., Schmidt, M., and Wels, W. (1998). Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Immunol Immunother* 47, 167-75.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J. L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 1, 489-95.
- Horvitz, H. R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res* 59, 1701s-1706s.
- Horvitz, H. R., Sternberg, P. W., Greenwald, I. S., Fixsen, W., and Ellis, H. M. (1983). Mutations that affect neural cell lineages and cell fates during the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 453-63.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-41.
- Huang, D. C., and Strasser, A. (2000a). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* 103, 839-42.
- Huang, D. C., Tschopp, J., and Strasser, A. (2000b). Bcl-2 does not inhibit cell death induced by the physiological Fas ligand: implications for the existence of type I and type II cells. *Cell Death Differ* 7, 754-5.
- Huang, H., Joazeiro, C. A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J. D., and Hunter, T. (2000c). The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem* 275, 26661-4.
- Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S., and Pastan, I. (1987). Functional domains of *Pseudomonas* exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in *E. coli*. *Cell* 48, 129-36.
- Ignéy, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277-88.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A. W., and Raff, M. C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol Biol Cell* 6, 1443-58.

- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell* 88, 347-54.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273, 9357-60.
- Jans, D. A., Jans, P., Briggs, L. J., Sutton, V., and Trapani, J. A. (1996). Nuclear transport of granzyme B (fragmentin-2). Dependence of perforin in vivo and cytosolic factors in vitro. *J Biol Chem* 271, 30781-9.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-64.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 369, 31-7.
- Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3, 221-7.
- Keppler-Hafkemeyer, A., Kreitman, R. J., and Pastan, I. (2000). Apoptosis induced by immunotoxins used in the treatment of hematologic malignancies. *Int J Cancer* 87, 86-94.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-57.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-88.
- Kischkel, F. C., Lawrence, D. A., Tinel, A., LeBlanc, H., Virmani, A., Schow, P., Gazdar, A., Blenis, J., Arnott, D., and Ashkenazi, A. (2001). Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276, 46639-46.
- Kojima, H., Shinohara, N., Hanaoka, S., Someya-Shirota, Y., Takagaki, Y., Ohno, H., Saito, T., Katayama, T., Yagita, H., Okumura, K., and et al. (1994). Two distinct pathways of specific killing revealed by perforin mutant cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1, 357-64.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-95.
- Krammer, P. H., Behrmann, I., Daniel, P., Dhein, J., and Debatin, K. M. (1994). Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6, 279-89.
- Kreitman, R. J. (1999). Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11, 570-8.
- Kreitman, R. J., Wilson, W. H., White, J. D., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Giardina, S., Waldmann, T. A., and Pastan, I. (2000). Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18, 1622-36.
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1998). Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-37.
- Kuida, K., Zheng, T. S., Na, S., Kuan, C., Yang, D., Karasuyama, H., Rakic, P., and Flavell, R. A. (1996). Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384, 368-72.
- Kummer, J. A., Kamp, A. M., Citarella, F., Horrevoets, A. J., and Hack, C. E. (1996). Expression of human recombinant granzyme A zymogen and its activation by the cysteine proteinase cathepsin C. *J Biol Chem* 271, 9281-6.
- Kummer, J. A., Kamp, A. M., van Katwijk, M., Brakenhoff, J. P., Radosevic, K., van Leeuwen, A. M., Borst, J., Verweij, C. L., and Hack, C. E. (1993). Production and characterization of monoclonal antibodies raised against recombinant human granzymes A and B and showing cross reactions with the natural proteins. *J Immunol Methods* 163, 77-83.

- Leifert, J. A., Harkins, S., and Whitton, J. L. (2002). Full-length proteins attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity. *Gene Ther* 9, 1422-8.
- Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-98.
- Leone, G., Mele, L., Pulsoni, A., Equitani, F., and Pagano, L. (1999). The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 84, 937-45.
- Letai, A., Bassik, M. C., Walensky, L. D., Sorcinelli, M. D., Weiler, S., and Korsmeyer, S. J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-92.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
- Lilie, H., Schwarz, E., and Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr Opin Biotechnol* 9, 497-501.
- Lincz, L. F. (1998). Deciphering the apoptotic pathway: all roads lead to death. *Immunol Cell Biol* 76, 1-19.
- Liu, X., Li, P., Widlak, P., Zou, H., Luo, X., Garrard, W. T., and Wang, X. (1998). The 40-kDa subunit of DNA fragmentation factor induces DNA fragmentation and chromatin condensation during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8461-6.
- Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1964). Programmed cell death. II: Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10, 643.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2001). Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 545-50.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Lowe, S. W., and Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 21, 485-95.
- Lowin, B., Beermann, F., Schmidt, A., and Tschopp, J. (1994). A null mutation in the perforin gene impairs cytolytic T lymphocyte- and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11571-5.
- Ludwig, A., Bauer, S., Benz, R., Bergmann, B., and Goebel, W. (1999). Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* 31, 557-67.
- Manoil, C., and Beckwith, J. (1985). TnpA: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8129-33.
- Marsden, V. S., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Silke, J., Metcalf, D., Ekert, P. G., Huang, D. C., Cecconi, F., Kuida, K., Tomaselli, K. J., Roy, S., Nicholson, D. W., Vaux, D. L., Bouillet, P., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002). Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 419, 634-7.
- Martin, S. (2003). Caspase activation and the demolition phase of apoptosis. Conference Apoptosis 2003: From signaling pathways to therapeutic tools, Luxembourg, 29.1.-1.2.2003.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 10, 417-26.
- Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2000). Necrotic death pathway in Fas receptor signaling. *J Cell Biol* 151, 1247-56.

- Mattson, M. P., Duan, W., Pedersen, W. A., and Culmsee, C. (2001). Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 6, 69-81.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Altenschmidt, U., Stocklin, E., Wels, W., and Groner, B. (1998). Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 2661-6.
- Medema, J. P., de Jong, J., Peltenburg, L. T., Verdegaal, E. M., Gorter, A., Bres, S. A., Franken, K. L., Hahne, M., Albar, J. P., Melief, C. J., and Offringa, R. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11515-20.
- Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., Peter, M. E., Offringa, R., and Krammer, P. H. (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 27, 3492-8.
- Meergans, T., Hildebrandt, A. K., Horak, D., Haenisch, C., and Wendel, A. (2000). The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *Biochem J* 349, 135-40.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., and Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-28.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D. J., Dong, Z., Venkatachalam, M. A., and Saikumar, P. (2001). Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 276, 18361-74.
- Mittl, P. R., Di Marco, S., Krebs, J. F., Bai, X., Karanewsky, D. S., Priestle, J. P., Tomaselli, K. J., and Grutter, M. G. (1997). Structure of recombinant human CPP32 in complex with the tetrapeptide acetyl-Asp-Val-Ala-Asp fluoromethyl ketone. *J Biol Chem* 272, 6539-47.
- Moriishi, K., Huang, D. C., Cory, S., and Adams, J. M. (1999). Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9683-8.
- Morimoto, H., and Bonavida, B. (1992). Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149, 2089-94.
- Moritz, D., Wels, W., Mattern, J., and Groner, B. (1994). Cytotoxic T lymphocytes with a grafted recognition specificity for ERBB2-expressing tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4318-22.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibin, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gauldie, J., and Bleackley, R. C. (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Murphy, M. E., Moul, J., Bleackley, R. C., Gershenfeld, H., Weissman, I. L., and James, M. N. (1988). Comparative molecular model building of two serine proteinases from cytotoxic T lymphocytes. *Proteins* 4, 190-204.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-27.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-52.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-8.

- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-42.
- Nicholson, D. W. (2000). From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407, 810-6.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997). Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *Embo J* 19, 3159-67.
- Onda, M., Willingham, M., Wang, Q. C., Kreitman, R. J., Tsutsumi, Y., Nagata, S., and Pastan, I. (2000). Inhibition of TNF-alpha produced by Kupffer cells protects against the nonspecific liver toxicity of immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38, LMB-2. *J Immunol* 165, 7150-6.
- Pai-Scherf, L. H., Villa, J., Pearson, D., Watson, T., Liu, E., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1999). Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin Cancer Res* 5, 2311-5.
- Pegram, M. D., Lipton, A., Hayes, D. F., Weber, B. L., Baselga, J. M., Tripathy, D., Baly, D., Baughman, S. A., Twaddell, T., Glaspy, J. A., and Slamon, D. J. (1998). Phase II study of receptor-enhanced chemosensitivity using recombinant humanized anti-p185HER2/neu monoclonal antibody plus cisplatin in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer refractory to chemotherapy treatment. *J Clin Oncol* 16, 2659-71.
- Pham, C. T., and Ley, T. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8627-32.
- Pham, C. T., Thomas, D. A., Mercer, J. D., and Ley, T. J. (1998). Production of fully active recombinant murine granzyme B in yeast. *J Biol Chem* 273, 1629-33.
- Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Barry, M., and Bleackley, R. C. (2000). Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 17-24.
- Pinkoski, M. J., Hobman, M., Heibein, J. A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C. J., and Bleackley, R. C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 92, 1044-54.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibein, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C., and Green, D. R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 276, 12060-7.
- Pinkoski, M. J., Winkler, U., Hudig, D., and Bleackley, R. C. (1996). Binding of granzyme B in the nucleus of target cells. Recognition of an 80-kilodalton protein. *J Biol Chem* 271, 10225-9.
- Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9, 505-12.
- Quan, L. T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S. J., Poirier, G. G., Ray, C., Pickup, D. J., and Salvesen, G. S. (1996). Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1972-6.
- Raff, M. C., Barres, B. A., Burne, J. F., Coles, H. S., Ishizaki, Y., and Jacobson, M. D. (1993). Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 262, 695-700.
- Ranger, A. M., Malynn, B. A., and Korsmeyer, S. J. (2001). Mouse models of cell death. *Nat Genet* 28, 113-8.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-84.



- Rohrbach, F., Gerstmayer, B., Biburger, M., and Wels, W. (2000). Construction and characterization of bispecific costimulatory molecules containing a minimized CD86 (B7-2) domain and single chain antibody fragments for tumor targeting. *Clin Cancer Res* 6, 4314-4322.
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., and Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423-88.
- Ronday, H. K., van der Laan, W. H., Tak, P. P., de Roos, J. A., Bank, R. A., TeKoppele, J. M., Froelich, C. J., Hack, C. E., Hogendoorn, P. C., Breedveld, F. C., and Verheijen, J. H. (2001). Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 40, 55-61.
- Roshal, M., Zhu, Y., and Planelles, V. (2001). Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 6, 103-16.
- Rotonda, J., Garcia-Calvo, M., Bull, H. G., Geissler, W. M., McKeever, B. M., Willoughby, C. A., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. (2001). The three-dimensional structure of human granzyme B compared to caspase-3, key mediators of cell death with cleavage specificity for aspartic acid in P1. *Chem Biol* 8, 357-68.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., Thornberry, N. A., and Becker, J. W. (1996). The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-25.
- Roy, S., Bayly, C. I., Gareau, Y., Houtzager, V. M., Kargman, S., Keen, S. L., Rowland, K., Seiden, I. M., Thornberry, N. A., and Nicholson, D. W. (2001). Maintenance of caspase-3 proenzyme dormancy by an intrinsic "safety catch" regulatory tripeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6132-7.
- Rudel, T., and Bokoch, G. M. (1997). Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2. *Science* 276, 1571-4.
- Russell, J. H., and Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20, 323-70.
- Ryan, K. M., Phillips, A. C., and Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr Opin Cell Biol* 13, 332-7.
- Sabbatini, P., Lin, J., Levine, A. J., and White, E. (1995). Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev* 9, 2184-92.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y., and Tsujimoto, Y. (1999). Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation. *Nature* 401, 168-73.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-9.
- Sakahira, H., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2000). Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 275, 8091-6.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M., and Henkart, P. A. (1997). Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6, 209-15.
- Sartorius, U., Schmitz, I., and Krammer, P. H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2, 20-9.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-87.

- Schmidt, M., Maurer-Gebhard, M., Groner, B., Kohler, G., Brochmann-Santos, G., and Wels, W. (1999). Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors. *Oncogene* 18, 1711-21.
- Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (2000). The two CD95 apoptosis signaling pathways may be a way of cells to respond to different amounts and/or forms of CD95 ligand produced in different tissues. *Cell Death Differ* 7, 756-8.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285, 1569-72.
- Selliah, N., and Finkel, T. H. (2001). Biochemical mechanisms of HIV induced T cell apoptosis. *Cell Death Differ* 8, 127-36.
- Sharif-Askari, E., Alam, A., Rheaume, E., Beresford, P. J., Scotto, C., Sharma, K., Lee, D., DeWolf, W. E., Nuttall, M. E., Lieberman, J., and Sekaly, R. P. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *Embo J* 20, 3101-13.
- Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J. A., and Greenberg, A. H. (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *J Exp Med* 185, 855-66.
- Shi, L., Yang, X., Froelich, C. J., and Greenberg, A. H. (2000). Purification and use of granzyme B. *Methods Enzymol* 322, 125-43.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-70.
- Shikama, Y., U, M., Miyashita, T., and Yamada, M. (2001). Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp Cell Res* 264, 315-25.
- Shresta, S., MacIvor, D. M., Heusel, J. W., Russell, J. H., and Ley, T. J. (1995). Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5679-83.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., and Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* 10, 581-7.
- Simon, M. M., Hausmann, M., Tran, T., Ebnet, K., Tschopp, J., ThaHla, R., and Mullbacher, A. (1997). In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med* 186, 1781-6.
- Single, B., Leist, M., and Nicotera, P. (2001). Differential effects of bcl-2 on cell death triggered under ATP-depleting conditions. *Exp Cell Res* 262, 8-16.
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-6.
- Sloots, A. (1998). Construction and characterization of IgG-binding fusion proteins for targeted gene delivery. University of Groningen, The Netherlands.
- Smith, A., Waibel, R., Westera, G., Martin, A., Zimmerman, A. T., and Stahel, R. A. (1989). Immunolocalisation and imaging of small cell cancer xenografts by the IgG2a monoclonal antibody SWA11. *Br J Cancer* 59, 174-8.
- Smyth, M. J., McGuire, M. J., and Thia, K. Y. (1995). Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *J Immunol* 154, 6299-305.
- Spaeny-Dekking, E. H., Hanna, W. L., Wolbink, A. M., Wever, P. C., Kummer, A. J., Swaak, A. J., Middeldorp, J. M., Huisman, H. G., Froelich, C. J., and Hack, C. E. (1998). Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 160, 3610-6.

- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., and et al. (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28, 4117-25.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 8359-62.
- Stennicke, H. R., and Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1477, 299-306.
- Stinchcombe, J. C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G. M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-61.
- Strasser, A. (1999). Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize Lecture: the role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti-cancer therapy. *Int J Cancer* 81, 505-11.
- Strasser, A., Harris, A. W., Bath, M. L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-3.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45.
- Sun, J., Bird, C. H., Buzza, M. S., McKee, K. E., Whisstock, J. C., and Bird, P. I. (1999). Expression and purification of recombinant human granzyme B from *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 251-5.
- Sun, J., Bird, C. H., Sutton, V., McDonald, L., Coughlin, P. B., De Jong, T. A., Trapani, J. A., and Bird, P. I. (1996). A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* 271, 27802-9.
- Sun, X. M., Bratton, S. B., Butterworth, M., MacFarlane, M., and Cohen, G. M. (2002). Bcl-2 and Bcl-xL inhibit CD95-mediated apoptosis by preventing mitochondrial release of Smac/DIABLO and subsequent inactivation of X-linked inhibitor-of-apoptosis protein. *J Biol Chem* 277, 11345-51.
- Sutton, V. R., Davis, J. E., Cancilla, M., Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., Sedelies, K., Browne, K. A., and Trapani, J. A. (2000). Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med* 192, 1403-14.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., and Takahashi, R. (2001a). X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* 276, 27058-63.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001b). Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-7.
- Tak, P. P., Spaeny-Dekking, L., Kraan, M. C., Breedveld, F. C., Froelich, C. J., and Hack, C. E. (1999). The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 116, 366-70.
- Talanian, R. V., Yang, X., Turbov, J., Seth, P., Ghayur, T., Casiano, C. A., Orth, K., and Froelich, C. J. (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* 186, 1323-31.
- Tata, J. R. (1966). Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev Biol* 13, 77-94.
- Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T. J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* 12, 621-32.
- Thomas, D. A., Scorrano, L., Putcha, G. V., Korsmeyer, S. J., and Ley, T. J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14985-90.

- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267, 1456-62.
- Thornberry, N. A. (1999). Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* 6, 1023-7.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-6.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., Chapman, K. T., and Nicholson, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17907-11.
- Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2, REVIEWS3014.
- Trapani, J. A., Browne, K. A., Dawson, M., and Smyth, M. J. (1993). Immunopurification of functional Asp-ase (natural killer cell granzyme B) using a monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 195, 910-20.
- Trapani, J. A., Browne, K. A., Smyth, M. J., and Jans, D. A. (1996). Localization of granzyme B in the nucleus. A putative role in the mechanism of cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 271, 4127-33.
- Trapani, J. A., Jans, P., Smyth, M. J., Froelich, C. J., Williams, E. A., Sutton, V. R., and Jans, D. A. (1998). Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. *Cell Death Differ* 5, 488-96.
- Trapani, J. A., Klein, J. L., White, P. C., and Dupont, B. (1988). Molecular cloning of an inducible serine esterase gene from human cytotoxic lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6924-8.
- Trapani, J. A., Sutton, V. R., and Smyth, M. J. (1999). CTL granules: evolution of vesicles essential for combating virus infections. *Immunol Today* 20, 351-6.
- Trapani, J. A., Sutton, V. R., Thia, K. Y., Li, Y. Q., Froelich, C. J., Jans, D. A., Sandrin, M. S., and Browne, K. A. (2003). A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* 160, 223-33.
- Uherek, C. (1998a). Modulare Fusionsproteine als nicht-virales System für zellspezifischen Gentransfer. Dissertation, Universität Konstanz.
- Uherek, C., Fominaya, J., and Wels, W. (1998b). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* 273, 8835-8841.
- Uherek, C., Groner, B., and Wels, W. (2001). Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 523-534.
- Utz, P. J., and Anderson, P. (2000). Life and death decisions: regulation of apoptosis by proteolysis of signaling molecules. *Cell Death Differ* 7, 589-602.
- Van de Craen, M., Van den Brande, I., Declercq, W., Irmeler, M., Beyaert, R., Tschopp, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1997). Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *Eur J Immunol* 27, 1296-9.
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988). Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440-2.
- Vaux, D. L., and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell* 96, 245-54.
- Vaux, D. L., and Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2239-44.
- Vaux, D. L., Weissman, I. L., and Kim, S. K. (1992). Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* 258, 1955-7.

- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 102, 43-53.
- Verhagen, A. M., and Vaux, D. L. (2002). Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis* 7, 163-6.
- Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V., Lissy, N. A., Ratner, L., and Dowdy, S. F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* 5, 29-33.
- Wajant, H., Moosmayer, D., Wuest, T., Bartke, T., Gerlach, E., Schonherr, U., Peters, N., Scheurich, P., and Pfizenmaier, K. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* 20, 4101-6.
- Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C., Ueda, R., Kurahara, C. G., Christensen, J. L., Huang, M. T., Young, J. D., Ahmed, R., and Clark, W. R. (1994). Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10854-8.
- Wang, G. Q., Wieckowski, E., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X. M., and Rabinowich, H. (2001a). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J Exp Med* 194, 1325-37.
- Wang, X. (2001b). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-33.
- Waugh, S. M., Harris, J. L., Fletterick, R., and Craik, C. S. (2000). The structure of the pro-apoptotic protease granzyme B reveals the molecular determinants of its specificity. *Nat Struct Biol* 7, 762-5.
- Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., and Salemme, F. R. (1989). Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* 243, 85-8.
- Wei, M. C., Lindsten, T., Mootha, V. K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060-71.
- Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., and Korsmeyer, S. J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727-30.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B., and Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer* 60, 137-44.
- Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B., and Hynes, N. E. (1992). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res* 52, 6310-7.
- Wels, W., Schmidt, M., Jeschke, M., Groner, B., Beerli, R., Hynes, N. E., and Hoffmann, M. (1996). Recombinant fusion toxins targeted to members of the ErbB family of receptor tyrosine kinases. in: R. B. Lichtner und R. N. Harkin (Hrsg.): EGF receptor in tumor growth and progression; Ernst Schering Research Foundation Workshop 19; Springer 1996, 211-232.
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C., Smith, C. A., and et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3, 673-82.
- Wilhelm, E., Parry, M. A., Friebel, R., Tschesche, H., Matschiner, G., Sommerhoff, C. P., and Jenne, D. E. (1999). Generation of catalytically active granzyme K from Escherichia coli inclusion bodies and identification of efficient granzyme K inhibitors in human plasma. *J Biol Chem* 274, 27331-7.
- Winoto, A. (1997). Cell death in the regulation of immune responses. *Curr Opin Immunol* 9, 365-70.

- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W., and Mak, T. W. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 12, 806-19.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306.
- Yang, X., Stennicke, H. R., Wang, B., Green, D. R., Janicke, R. U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G. S., and Froelich, C. J. (1998). Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 273, 34278-83.
- Yu, D., and Hung, M. C. (2000). Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19, 6115-21.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993). The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 75, 641-52.
- Yuan, J., and Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* 407, 802-9.
- Zelphati, O., Wang, Y., Kitada, S., Reed, J. C., Felgner, P. L., and Corbeil, J. (2001). Intracellular delivery of proteins with a new lipid-mediated delivery system. *J Biol Chem* 276, 35103-10.
- Zhang, D., Beresford, P. J., Greenberg, A. H., and Lieberman, J. (2001). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5746-51.
- Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., and Flavell, R. A. (1999). Caspase knockouts: matters of life and death. *Cell Death Differ* 6, 1043-53.
- Zheng, T. S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D. W., Lazebnik, Y., and Flavell, R. A. (2000). Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 6, 1241-7.
- Zheng, T. S., Schlosser, S. F., Dao, T., Hingorani, R., Crispe, I. N., Boyer, J. L., and Flavell, R. A. (1998). Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13618-23.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., and Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 644-51.
- Zong, W. X., Lindsten, T., Ross, A. J., MacGregor, G. R., and Thompson, C. B. (2001). BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 15, 1481-6.
- Zornig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1-37.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-13.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-56.

## Publikationen

### Poster abstracts

#### **Effects of Recombinant Human Granzyme B on the Survival of Tumour Cells**

Ulrike Giesübel and Winfried Wels

*Apoptosis 2003: From Signalling Pathways to Therapeutic Tools; January 29-February 1 2003, Luxembourg*

#### **Expression and Functional Characterisation of Recombinant Human Granzyme B**

Ulrike Giesübel and Winfried Wels

*9<sup>th</sup> Euroconference on Apoptosis of the European Cell Death Organisation, October 13-16 2001, Vienna, Austria*

#### **Expression and Functional Characterisation of Recombinant Human Granzyme B for Use in Cancer Therapy**

Ulrike Giesübel and Winfried Wels

*11<sup>th</sup> AEK Congress of the German Cancer Society, April 4-6 2001, Heidelberg, Germany*

#### **Expression in the Yeast *Pichia pastoris* and Functional Characterisation of Recombinant Human Granzyme B**

Ulrike Giesübel and Winfried Wels

*Mechanisms of Cell Death 2000, 3<sup>rd</sup> Symposium of the International Cell Death Society, May 6-10 2000, El Escorial, Spain*

## **Danke...**

... an Herrn Prof. Tampé für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

... an Benjamin für die außergewöhnlich gute Zusammenarbeit, für das große Interesse an dem Projekt, für die Wiederbelebung meiner Motivation und Freude an der Arbeit, für die zahlreichen Diskussionen, die engagierte Unterstützung und Fortführung des Projekts und für Deine Freundschaft.

... an Gesa und Mathias für die herzliche Aufnahme - nicht nur im Arbeitskreis - in Freiburg, für die Unterstützung während der Einarbeitung und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank an Mathias für die Blutspende zur Klonierung der cDNA, auch wenn das Schmidt'sche Granzym B bisher nicht die Menschheit geheilt hat. Der Ausübung der Funktion des Ministeriums für Frauen, Familie und Soziales durch Gesa soll an dieser Stelle ebenfalls ein dankendes Andenken gesetzt werden.

... an alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitglieder der Institute in Freiburg und Frankfurt für das gute Arbeitsklima.

... an Barbara Schnierle für aufmunternde und relativierende Worte, ein offenes Ohr und Rat in arbeitsrelevanten und allgemeinen Lebensfragen.

... an Martin Zörnig für die engagierte Korrektur der Einleitung und Rat bei Apoptose-Fragen.

... an Prof. Winfried Wels für die Gelegenheit, eineinhalb Jahre in Freiburg zu leben, für das kontinuierliche Interesse an dem Projekt, die Unterstützung und besondere Wertschätzung meiner Arbeit, die außerordentlich motivierenden und hilfreichen Diskussionen, die engagierte Korrektur des Manuskripts und den enormen Zugewinn an Lebenserfahrung, nicht zuletzt für die Erfahrung, daß man auch mit 60% einer „Aufwandsentschädigung“ „nicht verhungern“ wird.



## Lebenslauf

Ulrike Giesübel  
Chemotherapeutisches Forschungsinstitut  
Georg-Speyer-Haus  
Paul-Ehrlich-Str. 42-44  
60596 Frankfurt

|                       |  |
|-----------------------|--|
| geb.                  | 25.11.1970 in Kassel   |
| 1977-1981             | Grundschule am Richtsberg, Marburg   |
| 1981-1990             | Gymnasium Elisabethschule, Marburg   |
| Aug. 1990 -Febr. 1991 | „Au-pair“-Aufenthalt in Lyon, Frankreich   |
| 1991-1996             | Studium der Chemie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg  |
| Okt.–Dez. 1994        | Gaststudentin am Brasenose College der Universität Oxford, Praktikum im Department of Biochemistry im Arbeitskreis von Dr. E. J. C. Mellor   |
| Nov. 1995 -Dez. 1996  | Diplomarbeit im Fach Biochemie am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Universität Marburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. K. H. Seiffart<br>Thema: „Funktionelle Untersuchungen zur Interaktion des humanen Transkriptionsfaktors IIIB mit dem zellzyklusabhängigen Transkriptionsfaktor E2F und dem Retinoblastoma Protein (pRb)“ |
| Mai 1997              | Beginn der Promotion im Institut für Experimentelle Krebsforschung der Klinik für Tumorbologie, Freiburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Wels   |
| Okt. 1998             | Umzug der Arbeitsgruppe nach Frankfurt an das Georg-Speyer-Haus  |

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Entwicklung und Charakterisierung rekombinanter Formen der pro-apoptotischen Enzyme Granzym B und Caspase-3 zur gezielten Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen“ selbständig verfaßt und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Die Arbeit hat in gleicher Weise noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt, Mai 2003

(Ulrike Giesübel)